

Univerza v Ljubljani

Fakulteta za elektrotehniko

Alenka Maček Lebar

Vpliv električnih parametrov na elektroporacijo plazmaleme
v *in vitro* pogojih

Doktorska disertacija

Mentor: izr. prof. Damijan Miklavčič

Somentor: izr. prof. Gregor Serša

Ljubljana, 1999

Zahvala

Največ zaslug za nastanek pričujočega dela ima moj mentor izr. prof. Damijan Miklavčič, ki me je povabil v svet bioloških membran. Delo je ves čas usmerjal na pravo pot, mi s svojimi bogatimi izkušnjami svetoval ter mi pomagal odpravljati napake in pomankljivosti. Zahvaljujem se mu tudi za ves njegov trud in potrpljenje, ki ga je imel z menoj; pa za dobro voljo, ki jo je pri tem ohranil. Obenem sem iskreno hvaležna tudi akademiku prof. Lojzetu Vodovniku, ki me je navdušil nad kompleksnostjo bioloških sistemov in me širokosrčno sprejel v toplo gnezdo Laboratorija za biokibernetiko.

Večinoma je delo nastajalo na Onkološkem inštitutu v Ljubljani. Zahvaljujem se somentorju izr. prof. Gregorju Serši, ki me je ponudil prostor v svojem laboratoriju in mi s tem omogočil izvajanje poskusov na celičnih kulturah. Elektroporacije v pogojih *in vitro* me je naučila dr. Maja Čemažar. Zahvaljujem se ji za vso pomoč pri premagovanju začetniških težav. Množice poskusov ne bi bilo brez Mire Lavrič, ki je neutrudno skrbela za ves material, ki sem ga za poskuse potrebovala in potrpežljivo prenašala prezasedenost laboratorija. Iskrena hvala tudi za vse nasvete o gojenju celičnih kultur.

Kako skrbeti za nebogljene celice v celični kulturi, me je sicer že pred časom naučila doc. Urška Batista. Ves čas nastajanja tega dela sem ji bila, in še danes sem ji, od srca hvaležna za njeno šolo.

Zahvaljujem se doc. Alojzu Ihanu z Mikrobiološkega inštituta Medicinske fakultete v Ljubljani, ki mi je omogočil merjenje permeabilizacije celic s pretočnim citometrom in Nataši Andreji Kopitar, ki je ob obilici svojega dela meritve strokovno opravila. Ob pretočnem citometru sva prebili veliko ur....

Vse poskuse na umetnih lipidnih dvoslojih sem naredila v okviru študentskih izmenjav med Univerzo v Ljubljani in Johns Hopkins University, Baltimore, ZDA. Ob tej priliki se iskreno zahvaljujem Univerzi v Ljubljani in organizatorjem študentske izmenjave, še posebno prof. Janezu Možini, ki so mi dve leti zapored omogočili obisk Baltimorja. Na JHU me je v svoj laboratorij velikodušno sprejel prof. Leslie Tung. Zahvaljujem se mu za podporo in koristne komentarje. Umetnosti priprave umetnih lipidnih dvoslojev me je naučil mag. Gregory C. Troiano. Zelo sem mu hvaležna za vse nasvete in nesebično pomoč. Hvala tudi dr. Robertu Raphaelu, ki si je vedno našel proste trenutke za strokovne pogovore in mi v daljnem tujem svetu krajšal čas z zabavnimi zgodbami.

Za prijetno vzdušje se zahvaljujem vsem sodelavcem v Laboratoriju za biokibernetiko. Še posebno dr. Maši Kandušer, ki mi je priskočila na pomoč, kadar sem jo najbolj potrebovala; pa mag. Tadeju Kotniku, Marku Pucu, Janiju Pušenjaku in mag. Davidu Čukjatiju za koristne nasvete.

Za vso ljubezen, potrpežljivost in pomoč se zahvaljujem Andreju, ki je moral nemalokrat poleg očetovske vloge igrati tudi vlogo mame in Filipu Petru, ki se je trudil to razumeti.

Babicam in dedkom.
Brez njih nas ne bi bilo.

KAZALO

Povzetek	1
Abstract	3
1. Uvod	5
1.1 Membrana - osnovni element življenja	5
1.2 Elektroporacija - opis pojava	8
1.3 Dejavniki, ki vplivajo na elektroporacijo	11
1.3.1 Parametri električnega polja	12
1.3.2 Drugi dejavniki	13
1.3.3 Področja uporabe	14
1.4 Umetni lipidni dvosloj kot model biološke membrane	20
1.4.1 Prevodnost in kapacitivnost	20
1.4.2 Porušitvena napetost	21
1.4.3 Metodi študija elektroporacije	21
1.4.4 Parametri, s katerimi opišemo elektroporacijo	22
2. Materiali in metode	24
2.1 Poskusi <i>in vitro</i>	24
2.1.1 Celice	24
2.1.2 Elektroporacija	24
2.1.3 Preživetje celic	25
2.1.4 Permeabilizacija celic	26
2.1.5 Določitev praga reverzibilne, praga ireverzibilne elektroporacije in širine elektroporacijskega intervala	27
2.1.6 Določitev deleža živih, uspešno permeabiliziranih celic	29
2.1.7 Obdelava eksperimentalno dobljenih podatkov	31
2.2 Poskusi na planarnih lipidnih dvoslojih	33
2.2.1 Priprava planarnega lipidnega dvosloja	33
2.2.2 Meritev porušitvene napetosti	34
2.2.3 Statistična analiza	36
3. Rezultati	37
3.1 Vpliv električne energije na elektroporacijo <i>in vitro</i>	37
3.2 Prag reverzibilne elektroporacije	39
3.3 Prag ireverzibilne elektroporacije	41
3.4 Širina elektroporacijskega intervala	43
3.5 Žive uspešno permeabilizirane celice	44
3.6 Kriterijske funkcije	48
3.6.1 Elektrokemoterapija	48
3.6.2 Elektrotransfekcija	50
3.6.3 Roji v vzorcih vrednosti kriterijskih funkcij	51

3.7 Frekvenca pulzov	53
3.8 Vpliv časovnega zamika med pravokotnimi pulzi na porušitveno napetost planarnega lipidnega dvosloja	55
4. Razprava	59
5. Sklep	63
6. Literatura	64
Zahteva po priznanju avtorstva za izvirnost prispevkov	74
Izjava	75
Dodatek	76

Povzetek

Elektroporacija je pojav, pri katerem zaradi prisotnosti kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza v plazmalemi nastajajo strukturne spremembe, največkrat jih imenujemo kar "pore". Ob zadostnem številu le-teh in njihovi ustrezni velikosti se poveča prepustnost plazmaleme. To povečanje prepustnosti omogoči ionom, majhnim molekulam in makromolekulam, za katere je sicer plazmalema nepremagljiva ovira, neposreden vstop v celično notranjost. Sprememba prepustnosti je lahko ireverzibilna (celica odmre) ali reverzibilna in je posledica znatnih sprememb v strukturi membrane, katerih natančni molekularni mehanizmi še vedno niso dobro poznani. Obstaja sicer vrsta modelov, ki opisujejo te mehanizme, toda rezultati poskusov niso še nobenega povsem potrdili.

Na elektroporacijo in povečanje prepustnosti plazmaleme ter vnos eksogenih molekul vplivajo številni dejavniki; električni parametri, kot so jakost električnega polja, trajanje pulza, število pulzov in frekvenca ter nekateri drugi dejavniki, kot so temperatura, prevodnost poracijskega medija, osmotski tlak in popolnost celičnega skeleta.

Permeabilizacija, ki je povzročena z električnim poljem, ima nekaj prednosti pred biokemičnimi metodami. Lahko jo uporabimo na vsaki celici, ne prizadene celičnega preživetja, je specifična za plazmalemo, ne prizadene membran celičnih organelov in povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij. Opisane lastnosti so vzrok njeni široki uporabnosti. Z elektropermeabilizacijo lahko vnašamo v celice gene in različne učinkovine, v celično membrano vstavljamo beljakovine, preučujemo aktivnost encimov *in vitro*, celično signalizacijo in označujemo celične strukture s specifičnimi označevalci. Z električnimi pulzi vnašamo v telo učinkovine prek kože in *ex vivo* antibiotike v celice.

Biološke membrane so vključene v veliko število življenjskih procesov, toda raznolikosti funkcij navkljub, je osnovna struktura vseh bioloških membran enaka. Sestavlja jo dvojni sloj lipidnih molekul, na obeh straneh pa so prisotni proteini in preostale nelipidne molekule. Lastnosti biološke membrane so postavile zahteve za modele bioloških membran. Danes najpogosteje uporabljeni model biološke membrane je lipidni dvosloj, bodisi planaren ali v obliki vescikla.

Osnovni namen doktorske disertacije je raziskati vpliv električnih parametrov na elektropermeabilizacijo v pogojih *in vitro*. Vpliv napetosti pravokotnih električnih pulzov, trajanja in števila pravokotnih električnih pulzov smo opazovali na celičnih kulturah *in vitro* (celična linija DC3F), vpliv frekvence pa na planarnih lipidnih dvoslojih.

Na osnovi preučevanja preživetja celic ob elektroporaciji in permeabilnosti celic s propidijevim jodidom smo določili pet parametrov, s katerimi lahko vrednotimo elektroporacijo v pogojih *in vitro*. To so: pragovna vredost reverzibilne in ireverzibilne elektroporacije, širina elektroporacijskega intervala, delež živih, uspešno permeabiliziranih celic, in napetost, pri kateri tak delež dosežemo.

Za prag reverzibilne elektroporacije smo postavili zahtevo, da je permeabiliziranih vsaj 50 % celic v opazovanem vzorcu. Ugotovili smo, da pragovna napetost

reverzibilne elektroporacije pri izbranem trajanju pulzov upada s številom pulzov v vlaklu. Upadanje je znatno do vlaka, ki vsebuje osem pulzov. Z uporabo daljših vlakov pa praga reverzibilne elektroporacije ne znižamo več. S študijo smo pokazali, da prag reverzibilne elektroporacije pri izbranem številu pulzov v vlaklu upada s trajanjem pulzov v vlaklu.

Prag ireverzibilne elektroporacije smo definirali kot napetost, pri kateri ostane živih le še 50% celic v opazovanem vzorcu. Pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije pri izbranem trajanju pulza upada s številom pulzov v vlaklu. Upadanje do števila šestnajst je znatno; pri večjem številu pulzov pa se prag ireverzibilne elektroporacije praktično ne spremeni več. Pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije upada s trajanjem pulzov v vlaklu, kadar je število pulzov v vlaklu konstantno.

Širina elektroporacijskega intervala določa napetostno območje v katerem je elektroporacija celic še zadovoljiva; bodisi s stališča elektropermeabilizacije celice, bodisi s stališča celičnega preživetja. S študijo smo pokazali, da trajanje pulzov v vlaklu nima znatnega vpliva na širino elektroporacijskega intervala. Širina elektroporacijskega intervala je odvisna od števila pulzov v vlaklu.

V okviru protokolov z enako med poskusom dovedeno električno energijo, a različnimi preostalimi električnimi parametri (število pulzov, trajanje pulza, frekvenca), je delež živih, uspešno permeabiliziranih celic različen. Dokler celice izpostavljamo napetostim, ki še ne povzročijo ireverzibilne elektroporacije, je uspešnost elektroporacije med protokoli z enako električno energijo določena s trajanjem pulzov v vlaklu.

Kriterijske funkcije smo definirali z namenom, da bi za željeno aplikacijo elektroporacije določili električne parametre, ki naj bi dali optimalen rezultat. Ugotovili smo, da so tako za elektrokemoterapijo kot tudi za elektrotransfekcijo ugodnejši protokoli, ki vsebujejo do vključno 8 daljših pulzov.

S poskusi na lipidnih dvoslojih smo želeli poiskati frekvenco pulzov, s katero lahko znižamo porušitveno napetost lipidnega dvosloja. V primeru šestnajstih pulzov dolžine 100 ms znaša ta frekvenca 10 kHz.

1. UVOD

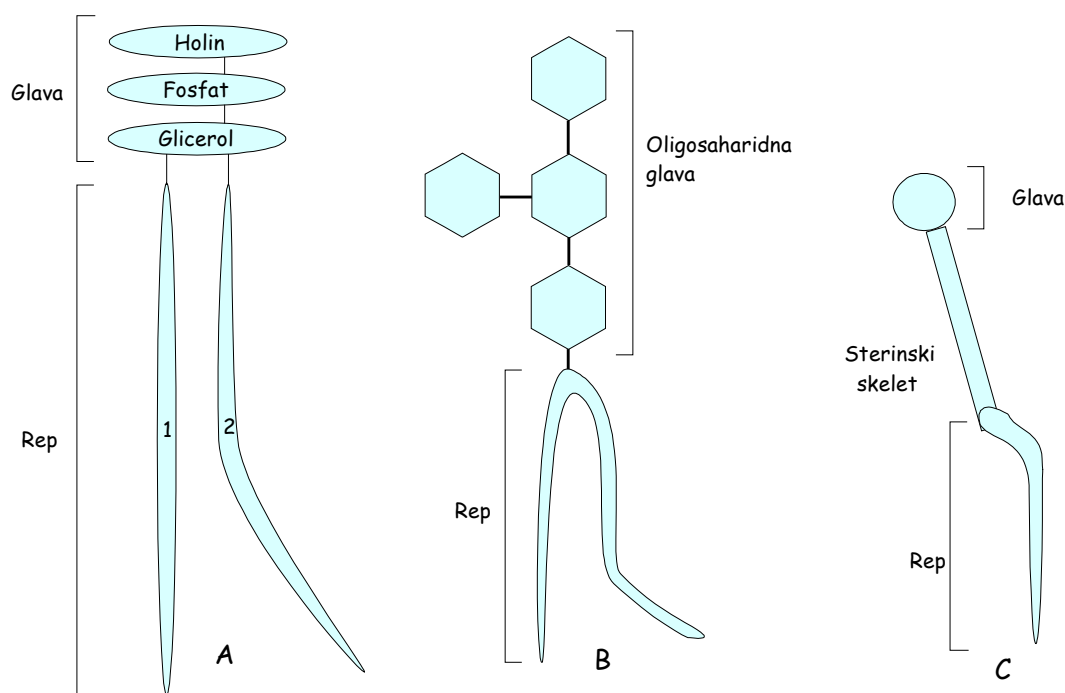
Celice so lahko zelo smešne. Le za malenkost jim spremenimo gojišče ali ostale pogoje, v katerih rastejo, in kot bi mignil, odmrejo. Lahko pa jih vzdražimo z električnim poljem, ki je dovolj veliko, da bi ubilo konja, in počele bodo tako neverjetne stvari, da znanstveniki o tem razpravljajo na konferencah, pišejo obsežne knjige in govorijo o čisto novi tehnologiji celične manipulacije.

Adrian Persegian

1.1 Biološka membrana - osnovni element življenja

Biološke membrane, med katere štejemo plazmalemo in membrane notranjih celičnih struktur, so vključene v številne življensko pomembne procese. Plazmalema ločuje notranjost celice od njenega okolja in z omejeno in selektivno prepustnostjo in aktivnim transportom vzdržuje razliko koncentracij različnih snovi med notranjostjo in okoljem. Biološka membrana je tista, ki omogoča prevajanje živčnih impulzov po telesu. Sodeluje pri pretvorbi svetlobe v kemično in električno energijo, dihanju in fotosintezi. Opravlja imunološke funkcije, sodeluje pri sintezi ter pri transportu snovi s fagocitozo in pinocitozo.

Kljub temu, da biološke membrane opravljajo tako različne funkcije, imajo enako osnovno strukturo. Vse biološke membrane so zgrajene iz dvosloja lipidnih molekul, v katerem se prosto gibljejo proteinske molekule [114]. Le te večinoma plavajo na površini lipidnega dvosloja, nekateri proteini pa lipidni dvosloj prebadajo. Biološke membrane večinoma sestavljajo trije tipi lipidov: fosfolipidi, glikolipidi in holesterol [10] (slika 1.1).



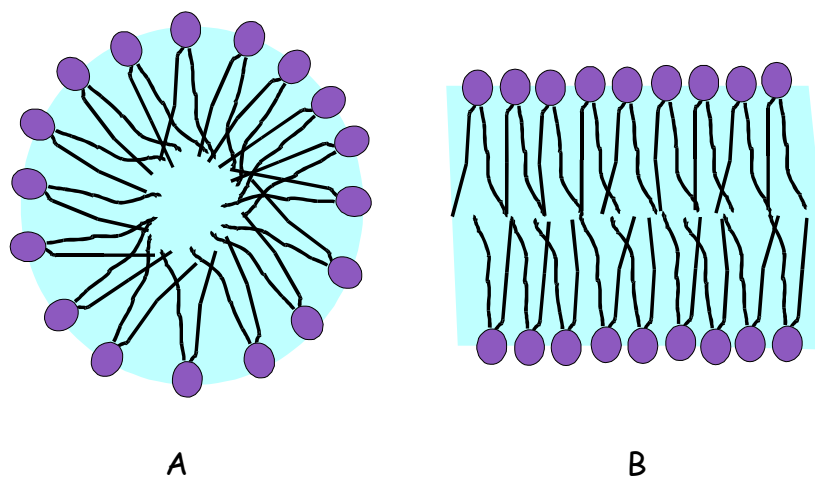
Slika 1.1. Molekule fosfolipida (A), glikolipida (B) in holesterola (C). Sliko smo povzeli po [10].

Fosfolipidi so estri fosforjeve kisline. Alkoholna komponenta estra je glicerol, ki ima dve –OH skupini zaestreni z maščobnima kislinama, eno pa s fosforjevo kislino, na katero je vezana organska baza holin [42].

Glikolipidi se od fosfolipidov razlikujejo po tem, da ne vsebujejo fosforjeve kisline, temveč sladkor. Običajno je to galaktoza, redkeje glukoza, lahko pa je sladkorjev tudi več [42]. Glikolipidi se nahajajo le na zunanji plasti lipidnega dvosloja biološke membrane. Najdemo jih v vseh živalskih celicah. Od tkiva do tkiva in od osebka do osebka se močno razlikujejo [10].

Holesterol je po kemični sestavi alkohol, v organih pa nastopa kot ester [42]. Molekula holesterola vsebuje sterinski skelet na katerega je na eni strani vezana –OH skupina, na drugi pa ogljikovodikova veriga.

Tako fosfolipidne kot tudi glikolipidne molekule in molekule holesterola imajo polarni hidrofilni in nepolarni hidrofobni del (slika 1.1). Polarni del molekule je v vseh treh primerih kompakten in ga zato imenujemo glava molekule, nepolarni del pa sestavljata ena ali dve ogljikovodikovi verigi različnih dolžin. Ogljikovodikove verige so lahko tako nasičene kot tudi nenasičene. Ta struktura molekulam določa značilno obnašanje v vodnem okolju. Molekule se orientirajo tako, da so z vodnim okoljem v stiku le polarni deli molekul. Zato v vodnem okolju spontano tvorijo micelle ali dvosloje (slika 1.2).



Slika 1.2. Micela sestavljena iz lipidnih molekul (A) in lipidni dvosloj (B) v vodnem okolju. Sliko smo povzeli po [10].

Kemijska sestava membrane določa njene lastnosti. Sestava lipidnega dvosloja določa na primer fluidnost membrane, specifične funkcije, ki smo jih omenili na začetku, pa so večinoma določene s proteinskimi molekulami.

Šele razvoj elektronskega mikroskopa je omogočil določitev natančne strukture biološke membrane. Prej so znanstevniki le teoretično privzeli, da je na površini celic in celičnega jedra prisotna membrana, ki zagotavlja razliko v sestavi notranjega medija in medija v okolici. Overtone je l. 1899 prvi opazil, da snovi, ki so topne v nepolarnih topilih hitreje prehajajo skozi površino rastlinskih protoplastov, kot snovi, ki so topne v vodi. Predpostavil je, da je površina celice impregnirana s snovjo, ki je podobna olju [6]. Nadaljna opazovanja bioloških membran in predvsem spoznanja o

njeni kompleksnosti so številne znanstvenike spodbudila k izgradnji modelov, ki bi uspešno predstavljali biološko membrano. Prvi model biološke membrane je naredil Beutner l. 1914; membrano je stvoril iz polarnih olj [6].

Realistični model biološke membrane mora izpolnjevati sledeče zahteve [110]:

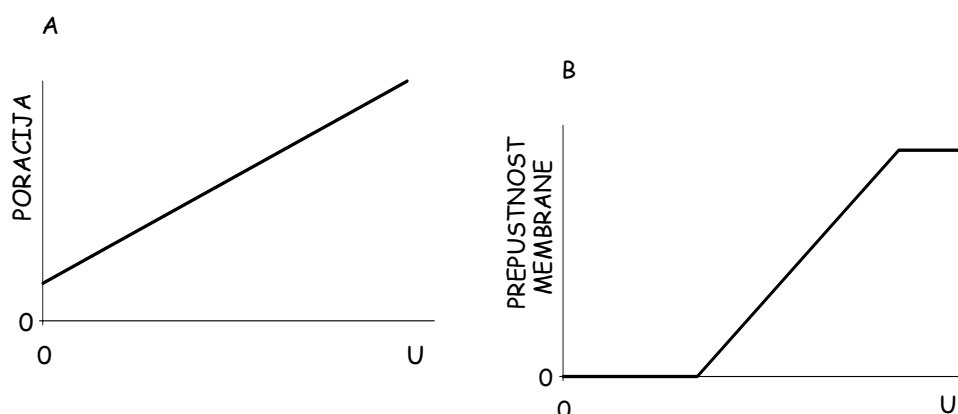
- ločevati mora različne vodne raztopine,
- omogočati mora tvorbo strukturne in kemične asimetrije,
- biti mora preprost, in omogočati študij membranskih funkcij, kot je na primer transport.

Danes najpogosteje uporabljeni model biološke membrane je lipidni dvosloj, bodisi planaren ali v obliki vescikla. Lipidne dvosloje namreč lahko tvorimo v vodnem okolju iz zelo različnih snovi; na primer iz naravnih in umetnih lipidov in umetnih površinsko aktivnih snovi. Debelina lipidnih dvoslojev je primerljiva z debelino bioloških membran (5 – 10 nm). V lipidni dvosloj zlahka vstavimo različne aditive, ki spremenijo lastnosti modelne membrane. Spremenimo lahko električne in mehanske lastnosti dvosloja, vplivamo na ionsko prepustnost in električno vzdražljivost. Z ustreznimi dodatki lahko dobimo celo fotoelektrične efekte [110].

Večina celic v normalnih fizioloških pogojih vzdržuje med celično notranjostjo in zunanostjo električno potencialno razliko, ki znaša nekaj deset milivoltov. Električno polje v plazmali je torej reda 10^7 V/m. Dodatno povečanje električnega polja v biološki membrani povzroči spremembe, katerih posledica je za 5-7 velikostnih redov povečana prevodnost membrane. V petdesetih in šestdesetih letih se je pojavila vrsta publikacij, ki so opisovale, da zunanje električno polje lahko vsili veliko transmembransko napetost na obeh polih celice. Raziskovalci so vedeli, da lahko zelo veliko električno polje povzroči celično smrt [90, 33]. Sale in Hamilton sta s poskusi na različnih bakterijah in eritrocitih ugotovila, da lahko transmembransko napetost, ki doseže kritično vrednost, povzroči spremembe v strukturi membrane, katerih rezultat je izguba polprepustnosti. Kritično vrednost transmembranske napetosti sta izračunala iz povprečnega premera celic in električne poljske jakosti, ki je povzročila uničenje 50 % celic v opazovani populaciji. Izračunane vrednosti vsiljene spremembe transmembranske napetosti so se pri vseh opazovanih celicah vrtele okrog enega volta [91]. Proti koncu sedemdesetih so odkrili, da električno polje, ki ga dovedemo v obliki zelo kratkega pulza, sicer poruši polprepustno strukturo membrane, vendar celica to lahko popravi in vzpostavi prvotno stanje [39]. V začetku osemdesetih so se pojavila poročila, da lahko ob permeabilizaciji membrane v celico vstopijo različne majhne molekule, kot so ioni, barvila in sladkorji, kasneje pa tudi o vnosu različnih makromolekul, kot so DNA in zdravila [125]. V zadnjem času je uporaba tega pojava skokovito narasla in se razširila, saj je povečanje prepustnosti celične membrane z električnim poljem neinvazivna, nekemična metoda, ki kakor kaže, ne prizadene biološke strukture in funkcij celice.

1.2 Elektroporacija - opis pojava

Elektroporacija je pojav, pri katerem zaradi prisotnosti že kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza v plazmalemi nastajajo strukturne spremembe, največkrat jih imenujemo kar "pore". Ob zadostnem številu le-teh in njihovi ustrezni velikosti se poveča prepustnost plazmaleme (slika 1.3). To povečanje prepustnosti membrane omogoči ionom, majhnim molekulam in makromolekulam, za katere je sicer plazmalema nepremagljiva ovira, neposreden vstop v celično notranjost. Sprememba prepustnosti je lahko ireverzibilna (celica odmre) ali reverzibilna in je posledica znatnih sprememb v strukturi membrane, katerih natančni molekularni mehanizmi še vedno niso dobro poznani. Obstaja sicer vrsta modelov [116], ki opisujejo te mehanizme, toda rezultati poskusov niso še nobenega povsem potrdili.

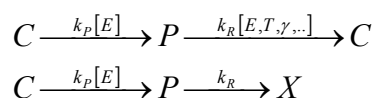


Slika 1.3. Elektroporacija in prepustnost membrane v odvisnosti od napetosti.

- A) Zaradi prisotnosti kratkotrajnega visokonapetostnega električnega pulza nastajajo v membrani strukturne spremembe; največkrat jih imenujemo pore, pojav pa elektroporacija.
 B) Šele ko je število por in njihova velikost dovolj velika, se poveča prepustnost celične membrane.

Povečanje prepustnosti celične membrane z električnimi pulzi lahko dosežemo tako na celicah, ki rastejo v celični suspenziji, kot tudi na tistih, ki rastejo v plasti, pritrjene na steno posode; *ex vivo* na tkivih in celicah ter *in vivo*.

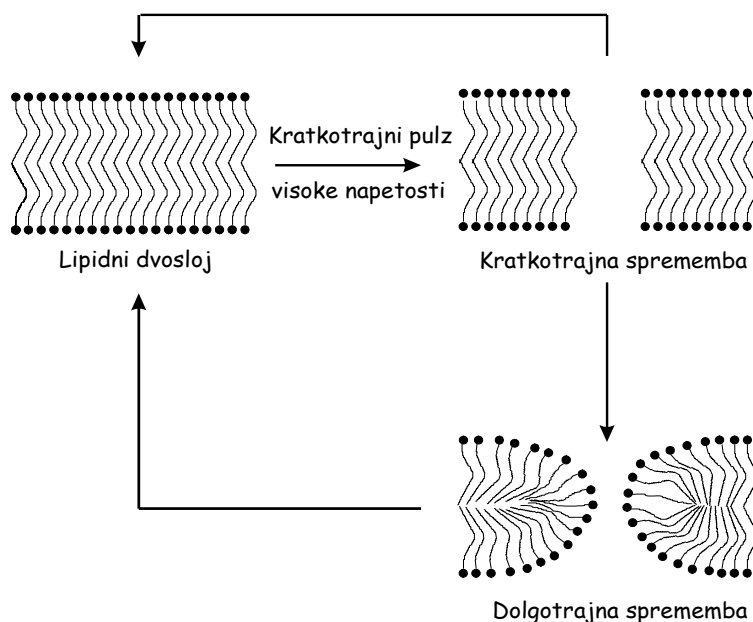
V splošnem lahko spremembe v strukturi membrane opišemo s preprosto shemo, kakršnih smo vajeni iz kemije [60]:



Začetno stanje plazmaleme, ki ima nizko prevodnost v primerjavi z visoko prevodnostjo citoplazme oziroma zunanjega medija, smo označili s C. Stanje povečane prepustnosti membrane označimo s P. Hitrostni koeficient elektroporacije je označen s $k_p[E]$ in je reda mikrosekund. Ko električno polje izključimo, se začne membrana urejati nazaj v prvotno stanje; hitrost tega procesa opisuje koeficient k_R . Koeficient k_R je lahko celo velikostnega reda nekaj minut. Če je elektroporacija povezana z vnosom snovi v celico ali izpuščanjem snovi iz celice, potem na ta način spremenjeno celico opišemo s tretjim stanjem, ki smo ga označili z X.

Zaradi zunanjega električnega polja se transmembranska napetost spremeni v nekaj mikrosekundah [43, 116]. Če je sprememba transmembranske napetosti dovolj velika, se zaradi nje spremeni struktura membrane. Sprememba transmembranske napetosti je premosorazmerna jakosti električnega polja in velikosti celice ter je odvisna od položaja na membrani. Čim bolj pravokotno tokovnice električnega polja prebadajo površino celice, tem večja je na tem mestu sprememba transmembranske napetosti. Prepustnost celične membrane nastopi pri pragovni vrednosti transmembranske napetosti. Večinoma prevladuje mnenje, da znaša pragovna vrednost transmembranske napetosti približno 1 V [68], čeprav v literaturi omenjajo tudi nižje vrednosti - okoli 200 mV [107].

Do kakšnih strukturnih sprememb pride v membrani zaradi prisotnosti električnega polja, nam zaenkrat ni znano. Največkrat si jih predstavljamo kot nekakšne pore v membrani - od tu izraz elektroporacija (slika 1.4).



Slika 1.4. Zelo preprosta shema por v membrani. Strukturne spremembe se med prisotnostjo zunanjega električnega polja večajo oziroma množijo. To so kratkotrajne spremembe v strukturi celične membrane. Ko zunanje električno polje izključimo, se lahko kratkotrajne strukturne spremembe preuredijo v osnovno stanje, ali pa v nekaj mikrosekundah zavzamejo stabilno konfiguracijo. Tako nastale spremembe imenujemo dolgotrajne, saj se le počasi (nekaj deset min) preuredijo v izhodiščno stanje.

Strukturne spremembe v plazmalemi, ki nastanejo v prisotnosti električnega polja, so nekakšen tristopenjski proces [59]. Pojavijo se ob pragovni transmembranski napetosti, ki seveda zahteva pragovno vrednost jakosti zunanjega električnega polja. Strukturne spremembe se med prisotnostjo zunanjega električnega polja večajo oziroma množijo. To so kratkotrajne spremembe v strukturi membrane. Ko zunanje električno polje izključimo, se lahko kratkotrajne strukturne spremembe preuredijo v osnovno stanje, ali pa v nekaj mikrosekundah zavzamejo stabilno konfiguracijo. Tako nastale spremembe imenujemo dolgotrajne, saj se le počasi (tudi nekaj deset minut) preuredijo v izhodiščno stanje (slika 1.4).

Povečanje prepustnosti plazmaleme, ki ga povzroči električno polje, omogoča vstop v celico različnim molekulam, od preprostih ionov do makromolekul. Kako bo molekula prišla v celico, je odvisno od njene velikosti, relativne molekulske mase in naboja (tabela 1.1). Danes prevladuje mnenje, da so dolgotrajne spremembe v strukturi membrane nekakšne vodne poti [31], ki omogočajo ionom in majhnim molekulam (do nekaj kDa) vstop v celico. Ko se prične povečevati prepustnost membrane, se vnos molekul povečuje z višanjem električne poljske jakosti in hitro doseže največjo vrednost (plato) (slika 1.3B). Pri nizkih jakostih električnega polja je transport nadzorovan z nekim, od električnega polja odvisnim procesom [78]. Zaenkrat vseh zakonitosti tega procesa še ne poznamo. Zaradi nekaterih lastnosti bi lahko sklepali, da je neznan proces elektroozmoza [24]; zaradi drugih, da je elektroforeza [31]. Pri višjih električnih poljskih jakostih, to je tistih, pri katerih dosežemo plato vnosa molekul, pa transport ni več odvisen od jakosti električnega polja [78]. Tudi natančna narava tega procesa ni poznana, lahko bi bila tudi preprosta difuzija [116]. Mnogi poskusi so namreč pokazali, da se koncentraciji majhnih molekul v notranjosti celice in v njeni okolici po elektroporaciji praktično ujemata [39, 50], kar podpira hipotezo, da je difuzija možna oblika transporta teh molekul. Ker lahko majhne molekule dodamo v celično okolico tudi po aplikaciji električnega polja, sklepamo, da so za njihov vnos odločilne dolgotrajne spremembe v celični membrani, ki jih lahko povzročimo že s kratkimi električnimi pulzi [3].

Molekula	Relativna molekulska masa (Da)	Količina molekul v notranjosti celice glede na zunanjo koncentracijo (%)
Lucifer rumeno	457	100
PI	660	90
BLM	1500	30
fragmenti oligonukleotidov	3000	20
PAP	30 000	10
FITC dekstran	70 000	<<1
protitelesa	150 000	0.1

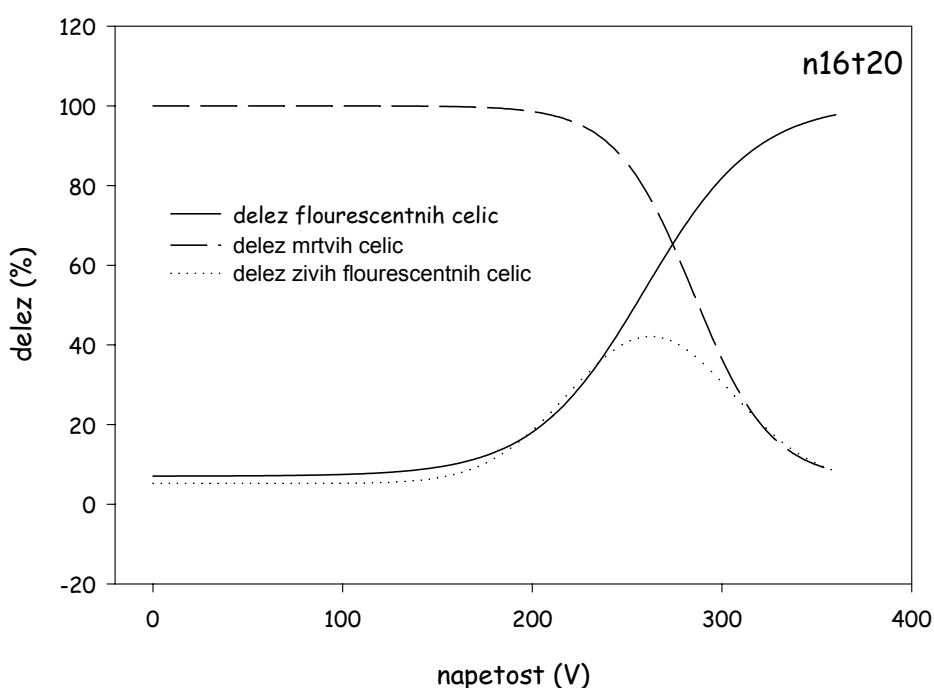
Tabela 1.1. Molekule, ki jih zelo pogosto uporabljamo za študij elektroporacije. Predstavljene so njihove relativne molekulske mase in količina molekul (glede na zunanjo količino), ki lahko pride v notranjost uspešno permeabilizirane celice ob optimalnih pogojih elektroporacije. PI - propidijev jodid, BLM – Bleomicin in PAP - ribosomska deaktivacijska beljakovina.

Makromolekule (protitelesa, encimi, nukleinske kisline) vstopijo v celico le v primeru, če so prisotne že med aplikacijo električnega polja; sklepamo, da so za njihov vnos odločilne kratkotrajne spremembe v strukturi membrane [68]. Makromolekule zato potrebujejo dlje trajajoče pulze ali večje število krajših pulzov [11, 60]. V literaturi opisanih poskusih ni navedeno, da bi se koncentracija makromolekul v celični notranjosti izenačila s koncentracijo makromolekul v celični okolici. Mehanizem prenosa teh molekul se zelo verjetno razlikuje od preproste difuzije. Koliko makromolekul bo med prisotnostjo električnega polja prišlo v celico, je odvisno od njihove relativne molekulske mase; težjih molekul bo v celico vstopilo manj kot lažjih [27].

Višja je jakost električnega polja, več celic je elektroporiranih. Toda hkrati se povečuje tudi delež celic, ki jih močno električno polje uniči (slika 1.5). Kadar je jakost električnega polja zelo velika, elektroporacije ne preživi nobena celica. Celično smrt zaradi izpostavljenosti močnemu električnemu polju razlagata dve hipotezi [117]:

- v nekaterih delih membrane nastane nenadna intenzivna sprememba v strukturi membrane, ki povzroči nastanek velike nepopravljive luknje v membrani;
- skozi začasne pore v membrani steče tokovi v notranjost celice in iz celice, kar tako močno poruši kemijsko ravnotežje, ki ga sicer vzdržuje membrana, da celica te spremembe ne preživi.

Zaenkrat sta to le hipotezi. Dodatne raziskave bodo pokazale, katera izmed obeh hipotez je pravilna; lahko pa bo čas obe ovrgel.



Slika 1.5. Delež fluorescentnih, živih fluorescentnih in mrtvih celic v odvisnosti od napetosti. Celice DC3F so bile izpostavljene šestnajstim pulzom dolžine 20 μ s ob prisotnosti propidijevega jodida.

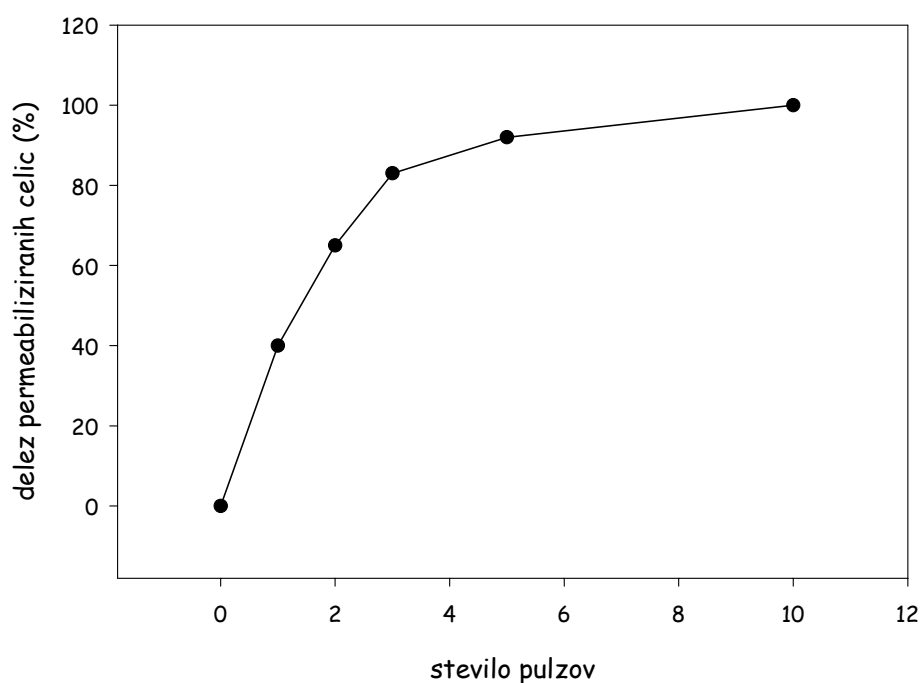
1.3 Dejavniki, ki vplivajo na elektroporacijo

Na elektroporacijo in povečanje prepustnosti plazmaleme ter vnos eksogenih molekul vplivajo številni dejavniki. Današnje znanje še ni popolno, zato se bomo omejili predvsem na električne parametre, kot so jakost električnega polja, trajanje pulza, število pulzov, frekvenca pulzov, in na nekatere druge dejavnike, za katere že vemo, da vplivajo na elektroporacijo.

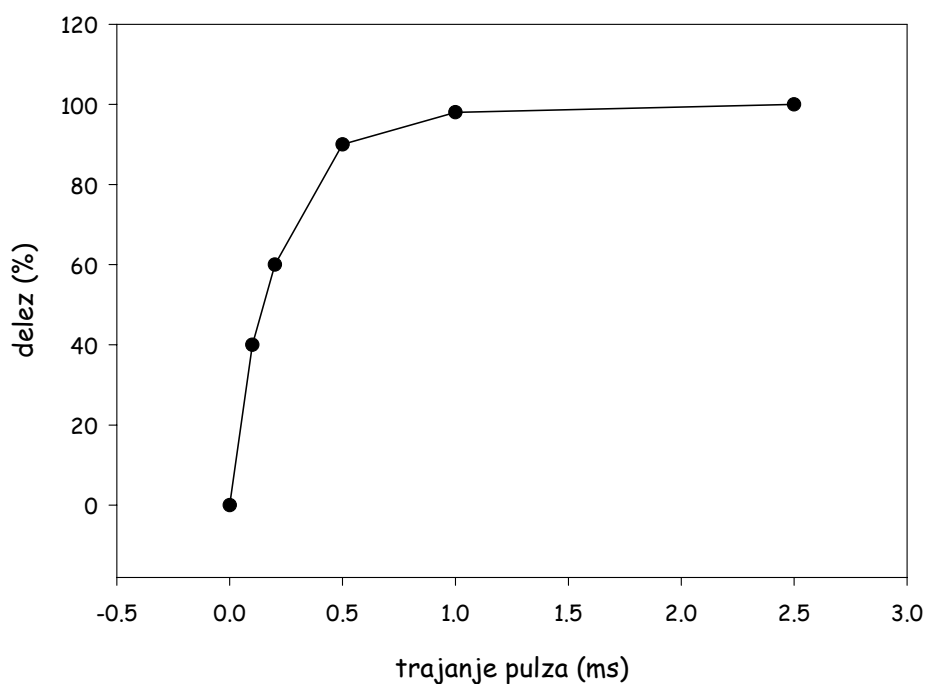
1.3.1 Parametri električnega polja

Elektroporacijo celice dosežemo tako, da celico izpostavimo električnemu polju z ustrežno električno poljsko jakostjo. Električna poljska jakost mora biti višja od pragovne in hkrati dovolj nizka, da plazmaleme ne poškoduje trajno.

Pri električni poljski jakosti, ki je višja ali enaka pragovni, tako povečanje števila pulzov (slika 1.6), kot tudi podaljšanje trajanja pulzov (slika 1.7) izboljša učinkovitost permeabilizacije; seveda le do nekega platoja, ki ga dosežemo že pri relativno majhni vrednosti tako trajanja kot števila pulzov [78, 120]. Permeabilizacija je bolj učinkovita, če je čas med posameznimi pulzi krajši [120]. Pri vseh teh parametrih pa so seveda vrednosti omejene z njihovim vplivom na preživetje celic. Vrednosti parametrov so odvisne od velikosti celice, njene oblike, orientacije, gostote celic ipd. in se tako od celice do celice razlikujejo [31].



Slika 1.6. Delež permeabiliziranih celic v odvisnosti od števila pulzov. Dolžina enega pulza je bila 1 ms, jakost električnega polja med posameznim pulzom pa 900 V/cm. Celice CHO so bile pulzom izpostavljene ob prisotnosti propidijevega jodida [120].



Slika 1.7. Delež permeabiliziranih celic v odvisnosti od trajanja pulza. Celice CHO so bile izpostavljene petim pulzom ob prisotnosti propidijevega jodida. Jakost električnega polja med posameznim pulzom je bila 900 V/cm [120].

1.3.2 Drugi dejavniki

Temperatura

Elektroporacija ne spremeni temperature celic oziroma tkiva. Zaradi električnega polja, ki je prisotno le v kratkih časovnih intervalih, se temperatura visokopredvodnih medijev dvigne približno za 1°C, temperatura nizkopredvodnih medijev pa še manj. Elektroporacija torej ni termalni pojav [117].

Vnos snovi v celico je boljši, če so celice pred izpostavitvijo električnemu polju pri temperaturi mešanice vode in ledu (4°C) [126]. Na preživetje celic ta sprememba temperature praktično ne vpliva. Po aplikaciji električnih pulzov pa je najprimernejša inkubacijska temperatura 37°C, kar poveča učinkovitost poracije, preživetje pa je pri tej temperaturi največje [84].

Prevodnost medija

Vpliv električnega polja na površino membrane posredujejo ioni v okoliški tekočini z medploskovno polarizacijo. Za uspešno permeabilizacijo potrebujemo končno koncentracijo ionov v okoliškem mediju [59]. V tipično nizkopredvodnih medijih se namreč izrazito zmanjša vsiljena transmembranska napetost. Za permeabilizacijo je zato potrebno električno polje višjih jakosti oziroma dlje trajajoči pulzi [43, 60]. Višja

je koncentracija prostih ionov v mediju, učinkovitejša bo poracija, saj je nagib krivulje odvisnosti števila permeabiliziranih celic v populaciji od jakosti električnega polja bistveno bolj strm v visokoprevodnem kot v nizkoprevodnem mediju [60, 85].

Osmotski tlak

Poskusi na celicah, ki rastejo v plasti pritrjene na dno posode, so pokazali, da osmotski tlak močno vpliva na pragovno vrednost jakosti zunanega električnega polja, ki je bistveno večja pri višjem osmotskem tlaku [86]. Tudi plato elektropermeabilizacije dosežemo pri nižjem osmotskem tlaku pri izrazito manjših vrednostih jakosti električnega polja kot pri višjem osmotskem tlaku. Nižji je osmotski tlak, učinkovitejša je elektropermeabilizacija; saj je nagib krivulje odvisnosti števila permeabiliziranih celic v populaciji od jakosti električnega polja v tem primeru bistveno bolj strm. Učinkovitost permeabilizacije je odvisna samo od osmotskega tlaka med izpostavitvijo električnim pulzom in ne od osmotskega tlaka pred izpostavitvijo pulzom ali po njej. Na celice, ki jih poriramo v suspenziji, ima osmotski tlak podoben vpliv, le pragovna vrednost jakosti zunanega električnega polja je neodvisna od osmotskega tlaka [32, 86].

Popolnost celičnega skeleta

Če poškodujemo celični skelet, bodisi kemično ali s temperaturnim šokom, postanejo tako imenovane dolgotrajne spremembe v strukturi membrane nestabilne [87].

Poskusi na eritrocitih so pokazali, da enourna inkubacija celic pri temperaturi 50°C povzroči spremembe v konformaciji spektrina in s tem v spektrinsko-aktinskem kompleksu. Eritrociti so izgubili svojo značilno obliko, postali so okrogli. Posledica temperaturnega šoka je bil dvig praga električne poljske jakosti za elektroporacijo in nastanek le kratko trajajočih strukturnih sprememb v celični membrani, saj po zaključku aplikacije električnih pulzov ni bilo več mogoče zaznati sprememb v celični notranjosti [87].

Tudi snovi, ki poškodujejo mrežo spektrina in aktina, imajo na elektroporacijo podoben učinek; dolgo trajajoče strukturne spremembe izginejo prej kot v minuti [87].

1.3.3 Področja uporabe

Membrana je neprepustna za določeno molekulo, če le-ta sama ne more skozi membrano, in je izključena iz vseh membranskih transportov. Permeabilizacija, povzročena z električnim poljem, ima nekaj prednosti pred drugimi biokemičnimi metodami:

- lahko jo uporabimo na vsaki celici,
- ne prizadene celičnega preživetja,
- je specifična za plazmalemo in ne prizadene membran celičnih organelov,
- povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij.

Opisane lastnosti so vzrok njeni široki uporabnosti. Z elektropermeabilizacijo vnašamo v celice gene in zdravila. V celično membrano vstavljamo beljakovine. Z njeno pomočjo preučujemo aktivnosti encimov *in vivo* ter vnašamo v celice specifične inhibitorje znotrajcelične encimske aktivnosti. Preučujemo celično signalizacijo prek nadzora koncentracije ionov v citosolu [9, 71]. Raziskujemo, na kakšen način virusi okužijo rastline. S pomočjo električnih pulzov vnašamo v telo zdravila prek kože in *ex vivo* antibiotike v krvne celice. Celične strukture označujemo s specifičnimi označevalci, ki sicer ne morejo v celico.

Poglejmo si nekatera našeta področja podrobneje.

Molekularna genetika

Kadar za vnos genskega materiala v celico uporabljamo postopek z visokonapetostnimi električnimi pulzi, govorimo o elektrotransfekciji [40]. Prvič je to metodo uporabil Neumann leta 1982 na mišjih fibroblastih [61]. Danes metodo široko uporabljamo v molekularni biologiji in genetiki, saj z njo lahko vnesemo DNK v vsako prokariotsko in evkariotsko celico. Postopek je enostaven, ponovljiv in zelo učinkovit. V primerjavi z drugimi tehnikami, ki so danes v uporabi za vnašanje genskega materiala v žive celice, elektrotransfekcija povzroči najmanj sprememb na ciljni celici in najmanj mutacij na genskem materialu. Z elektroporacijo lahko vnesemo v celico izredno velike molekule DNK, tudi desetkrat večje kot z drugimi metodami [76].

Visoko učinkovitost metode dosežemo s pravilno izbiro dejavnikov, ki vplivajo na vnos DNK. DNK mora biti prisotna v mediju že pred nastopom električnega pulza. V visokoprevodnih medijih je elektrotransfekcija učinkovitejša kot v nizkoprevodnih medijih [123]. Učinkovitost transfekcije je največja, kadar celice izpostavimo električnim pulzom 10 s po dodatku DNK [121]. Transfekcija je najboljša v mediju z nevtralnim pH, celice naj bodo v eksponentni fazi rasti [122]. Amplitudo in trajanje pulza moramo prilagoditi vrsti celic. Sprva so uporabljali eksponentno upadajoče pulze, ki jih generiramo na osnovi praznjenja kondenzatorja [62]. Kasneje so začeli uporabljati pravokotne impulze, ki pa jih je težje in dražje generirati [39]. Kadar za transfekcijo uporabljamo pravokotne pulze, je bolj učinkovita transfekcija z daljšimi pulzi in večjim številom le teh [120, 122]. Najuspešnejši vnos DNK v celico dobimo s kombinacijo dveh pravokotnih pulzov [104]. Prvi pulz je kratek in ima visoko amplitudo. Povzroči poracijo celice, vendar zaradi kratkega trajanja le redko pride do vnosa DNK. Drugi pulz, ki prvemu lahko sledi po nekajsekundnem premoru, pa je dolg, a ima nizko amplitudo. Ta pulz omogoči molekulam DNK vstop v celico. Količina molekul DNK v celici je sorazmerna naboju drugega pulza. Na ta način lahko količino molekul DNK v celici povečamo za cel velikostni red. Vnos DNK v celico naj bi torej potekal v treh korakih [104, 112, 121]:

- DNK se usmeri v električnem polju,
- kationi spodbujajo pritrditev DNK na membrano - pride do nekakšnega medsebojnega mehničnega vpliva med DNK in poro,
- elektroforeza DNK v celico.

Zaenkrat prevladuje mnenje, da DNK vstopi v celico z elektroforezo. Zmanjšanje elektroforetične mobilnosti DNK, bodisi s povečanjem viskoznosti medija bodisi z zmanjšanjem naboja DNK, namreč povzroči manjši vnos DNK v celico [40].

Gene lahko zelo učinkovito vnesemo v celico tudi z izjemno kratkimi pulzi električnega polja, ki si sledijo zelo hitro; s frekvencami, ki jih uporabljamo pri prenašanju radijskih valov [11].

Elektrogeno zdravljenje

Z genskim zdravljenjem mutirani gen, ki določa neko bolezensko stanje, zamenjamo z normalnim. Da bi ta cilj dosegli, potrebujemo:

- gen, ki bo, če ga vstavimo v celico v relativno majhnih količinah, postal funkcionalen in bo tako povzročil izboljšanje zdravja;
- način, kako klonirani gen vstaviti v celico, ne da bi jo pri tem poškodovali.

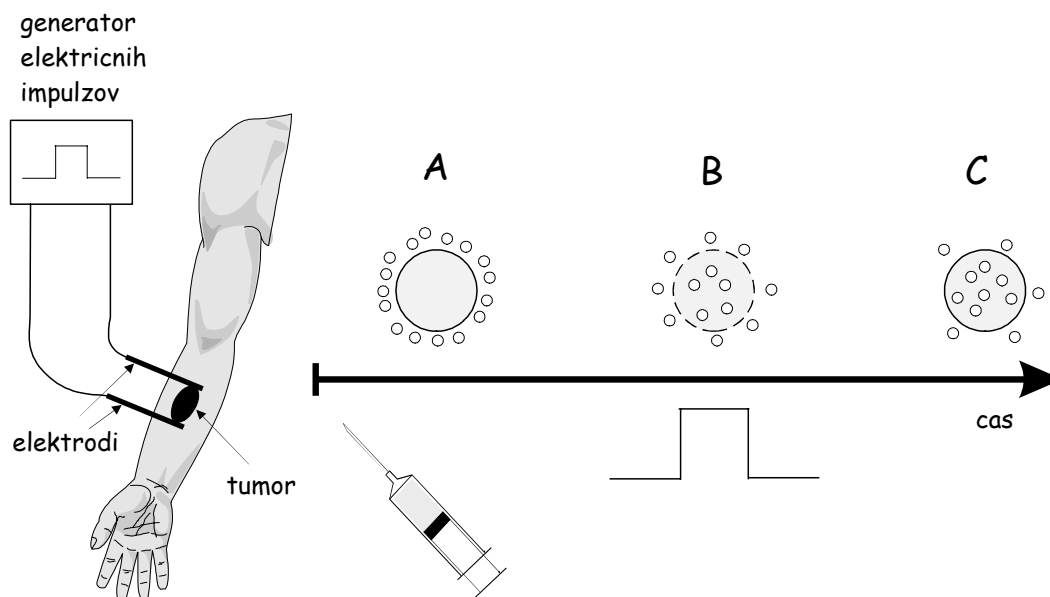
Danes poznamo kar nekaj genov, ki so primerni za gensko zdravljenje. Načinov, s katerimi vstavljamo gene v celico, je več. Najpogosteje so kot vektorji uporabljeni retrovirusi. Vnos genov z retrovirusi je bistveno uspešnejša metoda kot elektroporacija [76]. Vendar imajo retrovirusi pomanjkljivost: retrovirus, ki pride v celico, se naključno vključi v genom in zato lahko povzroči nezaželeno mutacijo. Pri elektroporaciji pa se elektroporirani geni rekombinirajo z njihovimi homolognimi gostiteljskimi geni. Celica ima novo obliko gena prav na mestu mutiranega gena, zato je metoda zelo zanesljiva. Še ena prednost elektroporacije obstaja: omogoča lokalno gensko zdravljenje. S kombinacijo lokalno apliciranih pulzov visoke napetosti in vnosa genov v arterijo lahko gene vstavimo le v celice želenih organov in tkiv *in vivo* [64].

Mir in sodelavci so uspešno vstavili plazmid DNK v tkivo skeletnih mišic. Ekspresija gena se je povečala več kot stokrat in ostala visoka in stabilna devet mesecev. V obsežni študiji, ki so jo naredili, so se kot najboljši električni parametri izkazali nekaj sekund dolgi pulzi z nižjo amplitudo, kot jo uporabljamo za permeabilizacijo tkiv z manjšimi molekulami [56]. Harrison in sodelavci pa so plazmid DNK vstavili v srčno tkivo, kar kaže, da je z elektroporacijo možno uspešno transformirati tudi ostala električno sklopljena tkiva [34]. Rols in sodelavci so pokazali, da je elektrogena terapija primerna tudi za zdravljenje rakavih obolenj [88]. Podobno kot Mir s sodelavci, so ugotovili, da so za transfekcijo genov v tkivo ugodnejše nižje napetosti in dolgi pulzi.

Elektrokemoterapija

Nekaj let za prvim uspešnim vnosom genskega materiala v celico z elektroporacijo se je rodila ideja, da bi na enak način v celico vnesli zdravila, ki sicer v celico le težko prodrejo ali pa vanjo sploh ne morejo. Ta problem je najbolj pogost pri zdravljenju rakavih obolenj s kemoterapijo. Nekatera citotoksična zdravila namreč le težko vstopijo v celico, kar pomeni, da potrebujemo visoko koncentracijo terapevtika v bližini celice. Visoke koncentracije v telesu pa povzročajo močne stranske učinke, ki so seveda nezaželeni. Vnos različnih učinkovin v celice z elektroporacijo so poimenovali elektrokemoterapija (slika 1.8).

Začetnika te nove veje sta Okino in Mohri [65], ki sta delala poskuse na podganah z umetno induciranimi tumorji. Uporabila sta le en električni pulz (10 kV), generiran z razelektritvijo kondenzatorja, in bleomicin, ki sta ga 30 minut prej vbrizgala v mišico v bližini tumorja. Tumorji, ki so bili zdravljeni z elektrokemoterapijo, so se po nekaj dneh bistveno zmanjšali, tumorji, zdravljeni samo s kemoterapijo ali elektroterapijo, pa ne [66]. Sočasno in neodvisno so tudi Belehradec Jr., Mir in Orłowski v Franciji naredili vrsto poskusov na celičnih kulturah in na živalih (miši). Ugotovili so, da se citotoksičnost zdravil, ki slabo prehajajo skozi celično membrano, z elektroporacijo bistveno poveča. Citotoksičnost netropsina se na primer poveča dvestokrat, citotoksičnost bleomicina pa kar sedemstokrat [30, 50, 69]. Bistveno manjši vpliv ima elektroporacija na zdravila, ki že sama po sebi hitro prehajajo skozi membrano (hipofilna zdravila npr. aktinomycin D). Toksičnost teh zdravil se zaradi prisotnosti električnega polja poveča le tri-do petkrat [69]. S poskusi na imunsko kompetentnih in imunsko zavrtih miših so ugotovili, da elektrokemoterapija spodbudi delovanje imunskega sistema; končni uspeh elektrokemoterapije na imunsko zavrtih miših je bil namreč bistveno slabši [51, 52, 92, 93]. Da z elektrokemoterapijo na neki način vzbudimo sistemsko protitumorsko imunost, so potrdili tudi poskusi s celicami, ki izločajo interleukin-2 (IL-2) [53]. Po elektrokemoterapiji so miškam vbrizgali gensko spremenjene histokompatibilne celice, ki izločajo IL-2. To je povzročilo popolno ozdravitev vseh z elektrokemoterapijo zdravljenih tumorjev in tudi netretiranih tumorjev, ki so bili inducirani na kontralateralni strani živali. Še več, zdravljenje je preprečilo nastanek novih tumorjev, kar so pokazali z vbrizganjem enakih tumorskih celic živalim, ki so jih ozdravili z elektrokemoterapijo. Podobne rezultate so dobili tudi Orłowski in sodelavci (miši) [70] in Ramirez in sodelavci, ki so kot eksperimentalne živali uporabili zajce [80].



Slika 1.8. Elektrokemoterapija tumorja. A: Molekule v veno vbrizganega zdravila obkrožijo tumorske celice. B: Pulz visoke napetosti povzroči nastanek por v celični membrani. Molekule učinkovine vstopijo v celično notranjost. C: Pore se zaprejo. Molekule učinkovine uničijo tumorske celice.

Elektrokemoterapija je že bila uspešno uporabljena tudi v klinični praksi. Posebno primerna je za zdravljenje tumorjev vratu in glave [4, 25, 29, 35, 36, 54, 55, 89, 94].

Z elektrokemoterapijo se ukvarjamo tudi v Sloveniji (Oddelek za tumorsko biologijo na Onkološkem inštitutu in Laboratorij za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko). Rezultati poskusov *in vitro* in *in vivo* Serše in sodelavcev so podprli rezultate drugih raziskovalnih skupin [95]. Pokazali so, da je elektrokemoterapija zelo uspešna tudi s *cis*-diamindikloroplatinom II (CDDP) in ne samo z bleomicinom, kot je bilo znano prej [20, 94, 96]. Posvetili so se iskanju optimalnega tipa in položaja elektrod, s katerimi apliciramo električne pulze. Predlagali so tretiranje tumorja z več strani, s spremembo orientacije elektrod med aplikacijo električnih pulzov [21]. Eksperimentalne rezultate so podprli z numeričnimi izračuni električnih polj v tumorjih [49, 97, 105], kar naj bi prispevalo k jasnejši sliki dogajanja med elektrokemoterapijo [98]. Elektrokemoterapijo so kombinirali s sočasnim vnosom tumorskega nekroznega dejavnika (TNF- α) [99]. Rezultati poskusov so pokazali, da je na ta način uporabljena koncentracija zdravila lahko nižja kot pri običajni elektrokemoterapiji. Na Onkološkem inštitutu so elektrokemoterapijo uporabili tudi v klinični praksi. Pri dveh bolnikih (maligni melanom) so uporabili elektrokemoterapijo z bleomicinom [89], pri štirih (maligni melanom, bazalni celični karcinom in skvamozni karcinom) pa elektrokemoterapijo s CDDP [94]. S slednjo so dosegli popolno regresijo vseh zdravljenih tumorjev.

Vstavljanje beljakovin v plazmalemo

Z visokonapetostnimi pulzi je mogoče v plazmalemo vstavljati beljakovine. Jakost električnega polja, v katerem so celice, mora biti ravno pod pragovno, ki je potrebna za permeabilizacijo [46, 58].

Že pred odkritjem vstavljanja beljakovin v celično membrano z visokonapetostnimi pulzi so stekli poskusi v želji, da bi aids pozdravili z glikoproteinom CD4. CD4 je receptor za HIV, ki ga najdemo na površini limfocitov T4. Ko se HIV pritrdi na CD4, HIV vstopi v limfocit T4 in se tam podvaja. Število HIV v krvnem obtoku se poveča, število limfocitov T4 pa zmanjša. Zdelo se je, da bi že dodatek prostega CD4 v krvi lahko pozdravil aids. Toda v krvnem obtoku je prosti glikoprotein CD4 zelo neobstoje, HIV pa ima veliko večjo afiniteto vezave s CD4, ki je vgrajen v membrano limfocitov T4, kakor pa vezave s prostim CD4. Zato bi bil terapevtski odmerek CD4, s katerim bi onemogočili vezavo HIV na limfocite T4, mnogo prevelik. Z visokonapetostnimi pulzi pa so glikoprotein CD4 vstavili v membrano eritrocitov [125]. Obstoječnost CD4 se je bistveno zvečala, afiniteta po vezavi s HIV pa je primerljiva s tisto pri limfocitih T4. Tako eritrociti vsrkajo viruse HIV, ki so prisotni v krvnem obtoku, in jih odstranijo.

Vnašanje antibiotikov v krvne celice

Za vnos antibiotikov v levkocite ni treba izolirati posameznih celic, temveč lahko celotno kri izpostavimo električnim pulzom. Metoda je namreč velikostno selektivna, saj večje celice postanejo prepustne pri nižji električni poljski jakosti kot manjše. V literaturi zasledimo podatek, da so uspeli permeabilizirati 70 % levkocitov, eritrociti pa so ostali nepermeabilizirani [101]. Na ta način lahko tretiramo velike količine krvnih celic. Tako dobimo imunokompatibilne nosilce zdravil po telesu. Najprej so stekli poskusi na eritrocitih [39], ki naj bi služili kot intravenozna skladišča zdravila.

Pomembno je, da ti nosilci prinesejo zdravilo na mesto vnetja, zato so nevtrofilce - celice, ki izvajajo fagocitozo - izločili iz krvi in vanje z elektroporacijo vnesli ustrezno zdravilo [102]. S poskusi na podganah so pokazali, da se tako nepulzirani kot tudi pulzirani nevtrofilci naberejo na področju vnetja v desetkrat višji koncentraciji kot na kontrolnih področjih in ohranijo svoje fagocitotične lastnosti. Posebno primeren se ta postopek zdi za zdravljenje v primerih, ko so obolenja težko dostopna, npr. v jetrih in pri okužbah v kosteh.

Vnos zdravil prek kože

Vnos zdravil prek kože je alternativa konvencionalnim načinom (oralni, z injekcijo). Toda koža sesalcev predstavlja po zaslugi odmrle plasti - *stratum corneum* nepremagljivo oviro vrsti snovi. Zato lahko preko kože vnesemo le peščico zdravil z majhnimi, večinoma lipofilnimi molekulami, zdravila z nabitimi polarnimi molekulami pa morajo v telo na konvencionalen način. Znanstveniki iščejo metode, ki bi povečale prehodnost takih zdravil. Kemijskim metodam sta se pridružili iontoforeza in elektroporacija. Pri iontoforezi kot gonilno silo za vnašanje nabitih in polarnih molekul uporabljamo enosmeren električni tok razmeroma nizkih jakosti. Iontoforeza je torej metoda, ki v svoji osnovi deluje na molekule zdravila. Električni pulzi, ki jih uporabljamo pri elektroporaciji, pa povzročijo začasne strukturne spremembe v koži (*stratum corneum*). Za razliko od iontoforeze pri elektroporaciji električno polje ne deluje na molekule zdravila, temveč na pot, po kateri te molekule pridejo v telo. Opazili so, da se tok polarnih molekul z naboji med - 1 in - 4 in molekularnimi težami malo več kot 1000 ob prisotnosti električnega polja poveča kar za štiri velikostne razrede [78]. Podoben tok so opazili tudi na živalski koži *in vivo* [113]. Količina zdravila, ki se kot posledica elektroporacije prenese preko kože, je linearno sorazmerna napetosti in trajanju uporabljenih pulzov električnega polja [113].

1.4 Umetni lipidni dvosloj kot model biološke membrane

V literaturi prevladuje mnenje, da je sprememba prepustnosti biološke membrane pod vplivom električnega polja posledica strukturnih sprememb v lipidnem dvosloju membrane [11, 12, 28, 59, 111]. Zato lahko vsaj nekatere lastnosti pojava opazujemo na modelu lipidnega dvosloja – planarnem lipidnem dvosloju, ki je v primerjavi z biološko membrano relativno preprost. Planarni lipidni dvosloj se sam po sebi od celične membrane bistveno razlikuje; toda ob privzetku, da se majhni vpeti delčki celične membrane obnašajo kot majhne planarne membrane, bi bili lahko osnovni koncepti porušitve lipidnega dvosloja veljavni tudi za celice [118]. Prav raziskave na planarnih lipidnih dvoslojih so pripeljale do prvih teoretičnih opisov mehanizmov elektroporacije [2, 14, 15, 18, 73-75, 103].

Ena od pglavitnih prednosti planarnega lipidnega dvosloja (tudi vesciklov) kot modela biološke membrane je, da lahko kontroliramo njegovo sestavo. Za tvorbo lahko uporabimo zelo različne lipide, njihove mešanice v različnih koncentracijah, lahko jim dodamo proteine, polimere in površinsko aktivne molekule [26].

V splošnem velja, da več lipidnih komponent uporabimo za tvorbo lipidnega dvosloja, bolj bo ta stabilen [110]. Zanimivo je, da iz čistega holesterola ne moremo tvoriti stabilnega lipidnega dvosloja, lahko pa ga tvorimo iz njegove oksidirane oblike [110]. Omeniti pa moramo, da kljub natančni pripravi raztopine najpreprostejšega lipida v enem od primernih topil (alkani, kloroform) povsem natančne kemične sestave lipidnega dvosloja ne poznamo. Sestava lipidnega dvosloja po procesu tanjšanja namreč ni enostavno povezana s sestavo raztopine iz katerega ga tvorimo [110].

Na planarnih lipidnih dvoslojih lahko zelo preprosto merimo njegove električne lastnosti – zato je tudi študij elektroporacije relativno preprost. Stimulacijski in merilni elektrodi namreč lahko postavimo na obe strani planarnega lipidnega dvosloja in spremljamo električno aktivnost. Največkrat merjene električne lastnosti planarnega lipidnega dvosloja so: prevodnost, kapacitivnost, porušitvena napetost in membranska napetost.

1.4.1 Prevodnost in kapacitivnost

Na električne lastnosti lipidnega dvosloja vpliva sestava celotne raztopine lipida; uporabljeni lipid in uporabljeno topilo. Na električne lastnosti pa imajo vpliv tudi lastnosti elektrolita, v katerem lipidni dvosloj tvorimo. Na večino običajno uporabljenih lipidov (lecitin, oksidirani holesterol, nekateri fosfolipidi) imajo običajni elektroliti, kot NaCl in KCl le majhen vpliv. Vendar to ne velja za vse elektrolite. Anioni, kot Br^- in SO_4^{2-} , povečujejo prevodnost lipidnega dvosloja. Enako velja tudi za nekatere katione (Fe^{3+}).

Dodatek različnih površinsko aktivnih molekul na eno ali obe strani lipidnega dvosloja ima različne posledice. S površinsko aktivnimi molekulami lahko povečamo prevodnost lipidnega dvosloja [110], generiramo membransko napetost ali vplivamo na stabilnost membrane [1].

Kapacitivnost planarnih lipidnih dvoslojev znaša od 0,3 do 1,3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Vrednost je odvisna od sestave raztopine lipida in sestave elektrolita [23]. Ob višji temperaturi je

kapacitivnost lipidnih dvoslojev manjša [119]. Kapacitivnost lipidnega dvosloja je odvisna tudi od časa, ki je minil od njegove izgradnje. S časom se povečuje, kar je povezano s procesom tanjšanja membrane [119].

1.4.2 Porušitvena napetost

Porušitvena napetost lipidnega dvosloja je odvisna od zgodovine membrane [1, 12]. Ugotovljeno je namreč, da lahko porušitveno napetost lipidnega dvosloja znižamo, če je na začetku električnega pulza napetost na lipidnem dvosloju različna od nič in seveda manjša od porušitvene napetosti opazovanega lipidnega dvosloja pri izbranem trajanju električnega pulza [1]. Z uporabo predhodnega visokonapetostega kratkega električnega pulza pred pulzom s katerim izzovemo reverzibilno elektroporacijo lahko znatno povečamo prevodnost lipidnega dvosloja ob reverzibilni elektroporaciji [12]. Porušitvena napetost lipidnega dvosloja je odvisna od dolžine uporabljenega električnega pulza [1, 7, 106] in od sestave raztopine lipida [13]. Porušitvena napetost lipidnega dvosloja se v večini primerov spremeni tako, če uporabimo drugačen lipid [13] kot tudi, če uporabimo drugačno topilo [15]. Porušitveno napetost lahko spremenimo z dodatkom površinsko aktivnih molekul; poloxamer 188 na primer porušitveno napetost poviša, $C_{12}E_8$ pa zniža [41, 100, 106]. Z dodatkom površinsko aktivnih molekul lahko spremenimo tudi časovni potek porušitve lipidnega dvosloja [41]. Če na lipidnem dvosloju tvorimo mreži podobno strukturo iz polimeriziranega aktina, ki je nekakšen model celičnega skeleta, se proces porušitve podaljša za tri velikostne razrede [48]. Porušitvena napetost ni odvisna od pH uporabljenega elektrolita na področju od $pH = 5$ do $pH = 9$ [7]. Pravtako ni odvisna od koncentracije uporabljenega elektrolita; le ta pa vpliva na hitrost porušitve lipidnega dvosloja [23]. Povišanje temperature povzroči znižanje porušitvene napetosti lipidnega dvosloja [7].

1.4.3 Metodi študija elektroporacije

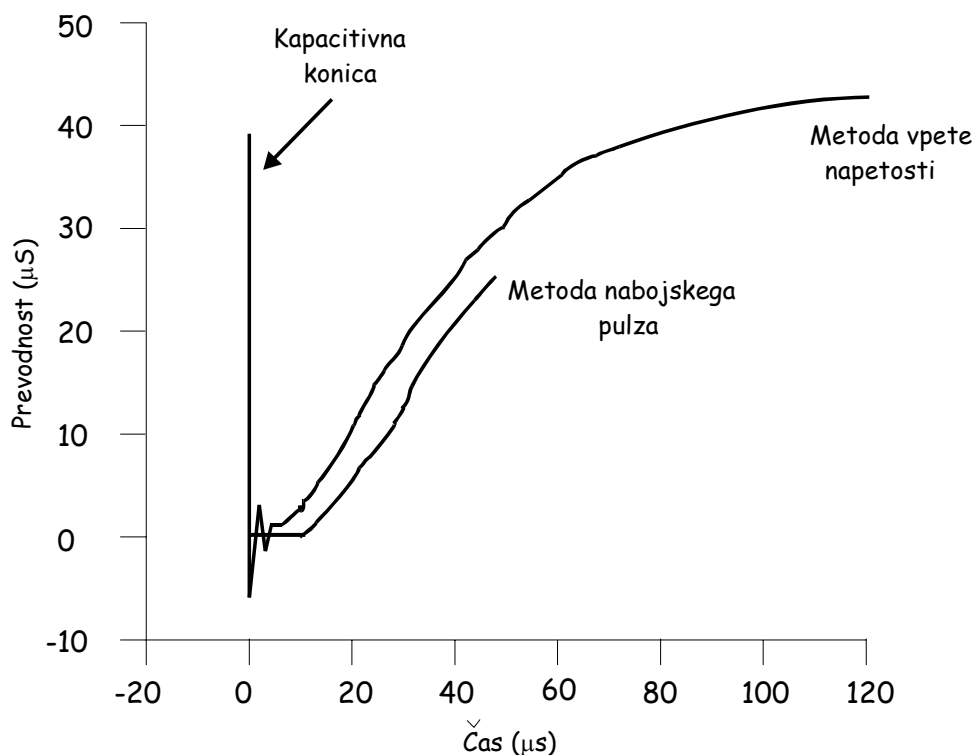
V literaturi opisane študije elektroporacije planarnih lipidnih dvoslojev temeljijo na dveh metodah: metodi nabojskega pulza (angl. charge pulse) [7, 41, 100] in metodi vpete napetosti (angl. Voltage clamp) [1, 13, 100].

Bistvo metode nabojskega pulza je, da je membrana izpostavljena napetosti le v času pulza. Potrebujemo hitro stikalo, ki razklene tokokrog v katerem je generator, sočasno s koncem električnega pulza. Razelektritev membrane, tj. upadanje napetosti na njej, opazujemo na zunanjem uporu znane upornosti. Lipidni dvosloj je porušen, ko se časovna konstanta razelektritve zmanjša.

Pri metodi vpete napetosti električnemu pulzu izbrane dolžine (pravokotna faza) sledi faza linearno padajoče napetosti. Dolžina te faze je odvisna od časovnega intervala, ki ga želimo opazovati. Metoda vpete napetosti tako omogoča študij časovnega poteka elektroporacije. Lipidni dvosloj je porušen, kadar v fazi linearno padajoče napetosti zaznamo naraščanje toka skozi membrano; amplitudo pravokotnega pulza zapišemo kot porušitveno napetost.

Metoda nabojskega pulza omogoča zelo natančno določitev porušitvene napetosti lipidnega dvosloja, saj se lipidni dvosloj vedno poruši med pravokotnim pulzom. Z

metodo vpete napetosti pa porušitveno napetost lipidnega dvosloja določimo le približno, saj se lipidni dvosloj lahko poruši tudi v fazi linearno padajoče napetosti (daljši pulz nižje napetosti). Povprečna porušitvena napetost planarnega lipidnega dvosloja izmerjena z metodo nabojskega pulza je nižja kot v primeru, ko jo merimo z metodo vpete napetosti [100]. Tudi življenski čas lipidnega dvosloja je krajši kadar ga merimo z metodo nabojskega pulza [100].



Slika 1.9. Primerjava časovnega poteka prevodnosti membrane ob meritvi z metodo nabojskega pulza in metodo vpete napetosti. Časovna odvisnost prevodnosti membrane je podobna v obeh primerih. Z metodo vpete napetosti lahko spremljamo prevodnost membrane daljši čas, kot z metodo nabojskega pulza. Slika je povzeta po Sharma et al 1996 [100].

1.4.4 Parametri, s katerimi opišemo elektroporacijo

Največkrat uporabljani parametri, s katerimi je v literaturi opisana elektroporacija planarnih lipidnih dvoslojev, so porušitvena napetost, življenski čas lipidnega dvosloja [1], zakasnilni čas, poelektroporacijska časovna konstanta [100, 106] in dvižni čas prevodnosti lipidnega dvosloja [100].

Porušitvena napetost lipidnega dvosloja pri danem trajanju električnega pulza, je napetost pri kateri se lipidni dvosloj ireverzibilno poruši. Ob poružitvi se prevodnost lipidnega dvosloja poveča za več velikostnih redov [7].

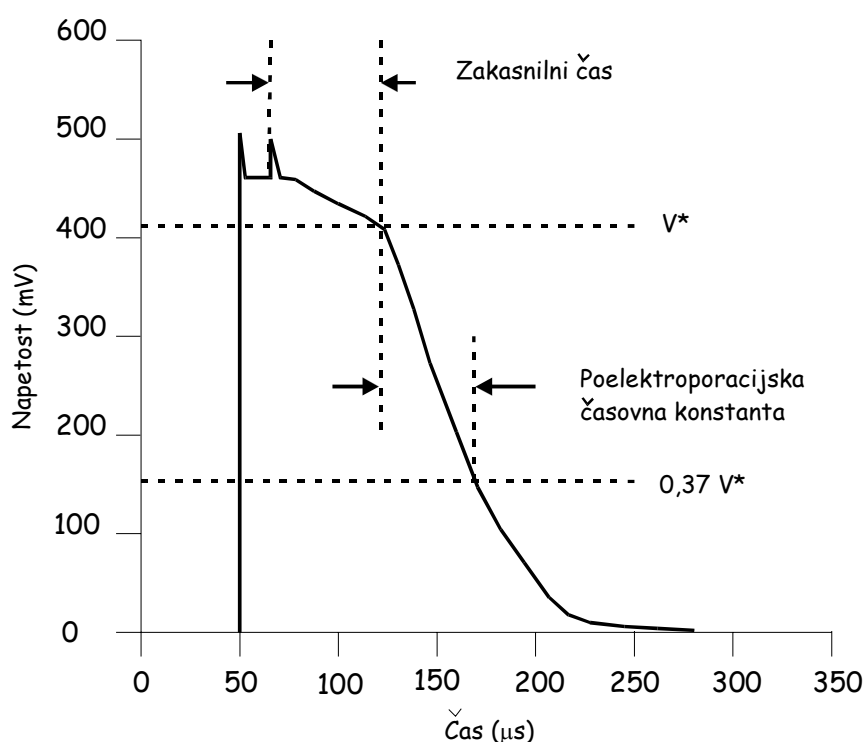
Življenski čas lipidnega dvosloja pri dani napetosti je definiran kot čas, merjen od začetka električnega pulza do trenutka, pri katerem zaznamo porast toka skozi dvosloj, ki je posledica poružitve lipidnega dvosloja [1]. Je naključna spremenljivka,

zato ga ponavadi podajamo s porazdelitvenimi funkcijami ali funkcijami vrjetnostne gostote [1, 15].

Zakasnilni čas je čas merjen od konca električnega pulza do pojava elektroporacije (slika 1.10) [100].

Poelektroporacijska časovna konstanta je definirana le v okviru meritev z metodo nabojskega pulza (slika 1.10). Čas od začetka elektroporacije do trenutka, ko napetost ob razelektritvi lipidnega dvosloja pade na 63% napetosti ob začetku elektroporacije, je poelektroporacijska časovna konstanta [100].

Dvižni čas prevodnosti lipidnega dvosloja lahko določimo le z metodo vpete napetosti. Definiran je kot čas v katerem doseže prevodnost lipidnega dvosloja 33% prevodnosti odprtine, na kateri lipidnega dvosloja ni [100].



Slika 1.10. Parametri elektroporacije, ki jih lahko ocenimo z metodo nabojskega pulza. Zakasnilni čas je čas, ki ga merimo od konca električnega pulza do pojava elektroporacije. Čas od začetka elektroporacije do trenutka, ko napetost ob razelektritvi lipidnega dvosloja pade na 63% napetosti ob začetku elektroporacije, je poelektroporacijska časovna konstanta. Slika je povzeta po Sharma et al 1996 [100].

2. MATERIALI IN METODE

2.1 Poskusi *in vitro*

Vse poskuse *in vitro* smo naredili na Oddelku za tumorsko biologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani.

2.1.1 Celice

Uporabili smo spontano transformirane pljučne fibroblaste kitajskega hrčka (DC3F; podvojitveni čas 12 h [8]), ki nam jih je velikodušno prepustil Jean Belehradec Jr. z inštituta Gustave Roussy, Villejuif v Franciji. Celice smo gojili v minimalnem esencialnem mediju tipa Eagle (EMEM; Sigma, ZDA), ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca. Obogatili smo ga s fetalnim telečjim serumom (Nalgene, Velika Britanija) tako, da smo dobili 10% raztopino. Gojišču smo dodali antibiotike streptomycin (100 µg/ml; Lek, Slovenija), gentamicin (11 µg/ml; Lek, Slovenija), penicilin (100 U/ml; Lek, Slovenija) in glutamin (10 mM; Gibco BRL, Velika Britanija). Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C v 5% CO₂ atmosferi in 90% vlagi. Rutinsko smo jih presajali dvakrat na teden s pomočjo 0,25% raztopine tripsina z EDTA (Hyclone, ZDA). Za poskuse smo uporabili celice v eksponentni fazi rasti.

2.1.2 Elektroporacija

Uporabili smo enak eksperimentalni protokol kot Čemažar M. [19]. Celice smo za poskuse nasadili na petrijevke z velikostjo 150 cm². Tretji dan njihove rasti smo jim zamenjali gojišče, četrty dan pa naredili poskus. Pred poskusom smo celice tripsinizirali. Tripsin smo po minuti odlili in po približno 5 minutah ustavili njegovo delovanje z gojiščem, ki je vsebovalo fetalni serum. Celice smo centrifugirali 5 min pri 4 °C in 1500 obratih/min. Nato smo jih resuspendirali v poracijskem mediju – gojišču, ki ni bilo obogateno s fetalnim serumom, dodali pa smo mu kalcijev klorid CaCl₂ (1M, Lekarna Kliničnega centra, Slovenija) tako, da je bila končna koncentracija CaCl₂ 0,5 mM. V tem gojišču smo pripravili gosto celično suspenzijo 2,2 x 10⁷ celic/ml. Za meritev fluorescence vnešenega propidijevega jodida smo 90 µl celične suspenzije, predno smo jo izpostavili napetostnim pulzom, dodali 10 µl raztopine propidijevega jodida (0,1 mM, Sigma, ZDA), ki smo ga raztopili v destilirani vodi (Zavod za transfuzijo Republike Slovenije, Slovenija). Za test klonogenosti pa smo pred terapijo z napetostnimi pulzi 90 µl celične suspenzije dodali 10 µl poracijskega medija.

Kapljico celične suspenzije s prostornino 50 µl smo postavili med vzporedni ploščati elektrodi s površinama 2 cm² (pravokotnik 1 cm x 2 cm) izdelanima iz nerjavečega jekla na Fakulteti za elektrotehniko po načrtih raziskovalne skupine prof. dr. Eberharda Neumanna. Poskusi, kjer smo celice izpostavili enemu pulzu dolžine 20 µs in spremljali njihovo preživetje, so zahtevali visoke napetosti, do 640 V. Ker generator visoko napetostnih pulzov, ki smo ga uporabili, lahko generira le pulze omejenih moči, smo pri teh poskusih uporabili kapljico s prostornino 25 µl, ki ima

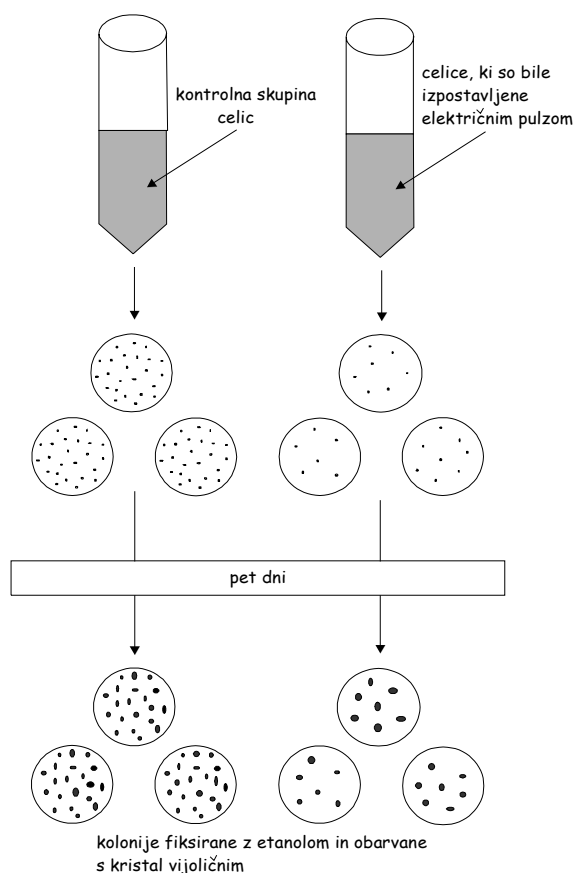
večjo upornost. Reža med elektrodama je merila 2 mm. Elektrodi smo pred vsakim poskusom umili v 96% etanolu in ju osušili s sterilno gazo. Na elektrodi smo privedli napetostni signal z ustreznim časovnim potekom (amplituda, trajanje pulzov, število pulzov, frekvenca pulzov).

Monofazne pravokotne napetostne pulze smo generirali z visokonapetostnim generatorjem Jouan GHT 1287 B (Societe Jouan, Francija). Napetost in tok smo med meritvami opazovali z dvokanalnim spominskim osciloskopom Hameg HM 205-3 (Hameg Elektronik, Nemčija). Pulze smo šteli z univerzalnim števcem HM 8021-3 (Hameg Elektronik, Nemčija).

Epruveto s celično suspenzijo smo med meritvami hranili pri temperaturi 4 °C. Po izpostavitvi visokonapetostnim pulzom pa smo celice 5 minut inkubirali na sobni temperaturi.

2.1.3 Preživetje celic

Preživetje celic po izpostavitvi napetostnim pulzom smo določali s testom klonogenosti (Slika 2.1). To je edini test v *in vitro* poskusih, ki pokaže reprodukcijsko sposobnost celic. Je enostaven in ponovljiv ter zaradi teh lastnosti predstavlja standard s katerim primerjamo druge metode za ugotavljanje celičnega preživetja [17].



Slika 2.1. Test klonogenosti. Iz vzorca celic, ki je bil izpostavljen električnim pulzom smo odmerili 600 celic in jih nasadili v tri petrijevke. Po petih dneh smo celice fiksirali s 96% etanolom in jih obarvali s kristal vijoličnim. Enako smo postopali s kontrolno skupino celic.

Po 5 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo iz vzorca celic, ki je bil izpostavljen električnim pulzom odmerili 600 celic in jih nasadili v tri petrijevke (v vsako po 200) v gojišče, kakršno smo uporabljali za gojenje celic. Po petih dneh smo gojišče odlili, celice fiksirali s 96% etanolom in jih obarvali s kristal vijoličnim barvilom (Kemika, Hrvaška). Delež preživetja smo določili kot razmerje med povprečnim številom kolonij v treh petrijevkah s celicami, ki so bile izpostavljene pulzom visoke napetosti in povprečnim številom kolonij v treh kontrolnih petrijevkah. S kontrolno skupino celic smo postopali povsem enako kot s tretiranimi celicami, le da na elektrodi nismo privedli napetostnega signala. Uspešnost nasaditve celic je bila pri vseh poskusih okrog 90%.

2.1.4 Permeabilizacija celic

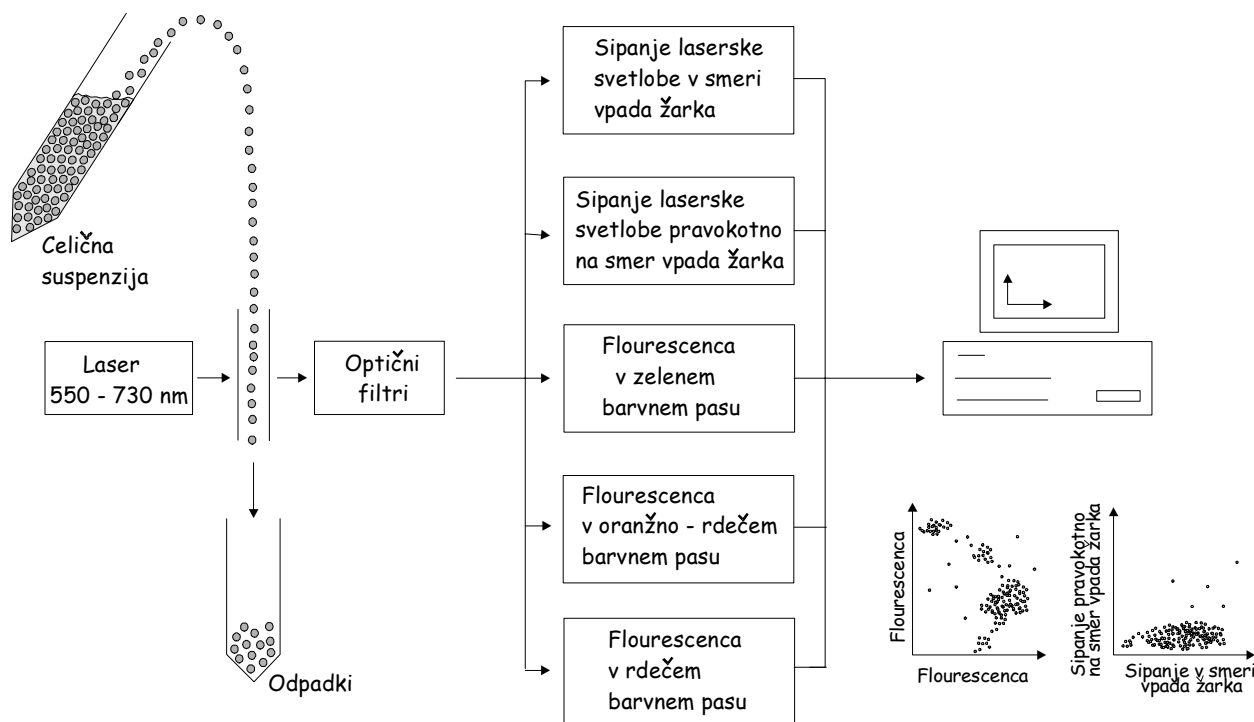
Elektropermeabilizacijo celic smo spremljali z merjenjem fluorescence propidijevega jodida. Propidijev jodid je fluorescentno barvilo, namenjeno označevanju DNK. Vezano na DNK fluorescira svetlobo v pasu valovnih dolžin 550 – 730 nm ob absorpciji svetlobe valovnih dolžin 430 – 570 nm [124]. Fluorescenca nevezanega propidijevega jodida je 1000-krat manjša [83]. Prav ta lastnost mu daje prednost pred drugimi fluorescentnimi barvili; po elektropermeabilizaciji nevezanega propidijevega jodida namreč ni potrebno odstraniti, saj meritve s pretočnim citometrom ne moti. Tako se izognemo odvečnemu pipetiranju in centrifugiranju, ki lahko dodatno mehansko poškoduje celice.

Meritve smo opravljali s pretočnim citometrom FACSort (Becton Dickinson, ZDA) na Mikrobiološkem inštitutu Medicinske fakultete v Ljubljani (Slika 2.2).

Računalniški sistem je avtomatsko zajemal sipanje laserske svetlobe v smeri vpada žarka (FSC-H), ki daje informacijo o velikosti in morfologiji delca na katerem se svetloba siplje, ter fluorescenco delca v pasu valovnih dolžin 550 – 730 nm (FL2 – H), ki je pokazatelj količine propidijevega jodida v opazovanem delcu.

Po 5 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo celice, ki so bile izpostavljene električnim pulzom dodali v epruveto, ki je vsebovala 1 ml fosfatnega pufra PBS. Epruvete smo do meritve s pretočnim citometrom hranili pri temperaturi 4 °C. Iz vsake epruvete smo izbrali vzorec 5000 delcev in izmerili FSC-H in FL2-H. Iz opazovanega vzorca smo odšteli tiste fluorescirajoče delce, ki po velikosti in morfologiji niso več ustrezali celicam (ostanki razpadlih celic). Delež permeabiliziranih celic smo določili iz razmerja med fluorescirajočimi delci in vsemi delci v preostalem vzorcu. Kontrolno meritev smo izvedli na celicah, s katerimi smo postopali povsem enako kot s tretiranimi celicami, le da na elektrodi nismo privedli napetostnega signala.

Opisani protokol smo povzeli po Marie – Pierre Rols [83]. Protokol naj bi zagotavljal nespremenjene podatke o elektropermeabilizaciji celic s propidijevim jodidom še nekaj ur po poskusu (do 4 h). Toda propidijev jodid sčasoma prehaja tudi v zdrave celice. Nekateri avtorji zato priporočajo, da meritev fluorescence opravimo v 30 minutah [115]. Naše meritve smo opravili približno 60 minut po tretiranju celic, zato smo nekaj fluorescentnih celic zaznali tudi v kontrolnih vzorcih.



Slika 2.2. Shematični prikaz meritve s pretočnim citometrom. Računalniški sistem je avtomatsko zajemal sipanje laserske svetlobe v smeri vpada žarka (FSC-H), ki daje informacijo o velikosti in morfologiji delca na katerem se svetloba siplje, ter fluorescenco delca v oranžno – rdečem barvnem pasu (FL2 – H), ki je pokazatelj količine propidijevega jodida v opazovanem delcu.

2.1.5 Določitev praga reverzibilne in praga ireverzibilne elektroporacije

Za vsak opazovani protokol izpostavitve celic pulzom visoke napetosti, tj. izbrano število napetostnih pulzov, izbrano trajanje pulzov v vlaku in izbrano frekvenco pulzov, smo določili preživetje celic in fluorescenco z napetostnimi pulzi vnešenega propidijevega jodida pri različnih amplitudah električnih pulzov.

Delež živih celic pri izbranem protokolu smo določili tako pri napetostih, ki celic še ne poškodujejo trajno, kot tudi pri napetostih, ki uničijo večino celic v opazovani populaciji. Na izmerjene točke deleža živih celic smo napeli sigmoidno krivuljo oblike:

$$d_p = d_{p0} + \frac{a_p}{1 + e^{\frac{U_p - U_{p0}}{b_p}}}, \quad (1)$$

kjer je d_p delež živih celic, U_p napetost, a_p , b_p , d_{p0} in U_{p0} pa parametri sigmoidne krivulje. Vsoto parametrov a_p in d_{p0} smo omejili z vrednostjo 100, ker realno delež živih celic v opazovani populaciji ne more biti večji od 100%. Parametru d_{p0} pa smo postavili omejitev $d_{p0} \geq 0$, saj realno delež živih celic ne more biti manjši od 0.

Definicija 1: PRAG IREVERZIBILNE ELEKTROPORACIJE

Prag ireverzibilne elektroporacije pri izpostavitvi celic pulzom visoke napetosti je tista napetost, pri kateri sigmoidna krivulja, ki opisuje delež živih celic v populaciji, doseže vrednost 50%.

Delež fluorescirajočih celic smo ravno tako določili na celotnem napetostnem intervalu; od napetosti, ki še ne povzročijo permeabilizacije, do napetosti, pri katerih so permeabilizirane praktično vse celice v opazovani populaciji. Na izmerjene točke deleža fluorescirajočih celic smo napeli sigmoidno krivuljo oblike:

$$d_f = d_{f0} + \frac{a_f}{1 + e^{-\frac{U_f - U_{f0}}{b_f}}}, \quad (2)$$

kjer je d_f delež fluorescirajočih celic, U_f napetost, a_f , b_f , d_{f0} in U_{f0} pa parametri sigmoidne krivulje. Vsoto parametrov a_f in d_{f0} smo omejili z vrednostjo 100, ker realno delež fluorescirajočih celic v opazovani populaciji ne more biti večji od 100%.

Parametru d_{f0} pa smo postavili dodatno omejitev $d_{f0} \geq 0$, saj realno delež fluorescirajočih celic ne more biti manjši od 0. Ta omejitev se je pokazala kot nepotrebna, saj smo pri vseh meritvah zaznali nekaj fluorescentnih celic tudi v kontrolnih vzorcih. Kot smo že omenili, so lahko to sicer žive celice v katere je propidijev jodid prišel z endocitozo ali pa celice, ki nadaljnega podvojevanja ne bi več preživele, vendar še ne kažejo večjih sprememb v morfoloških značilnostih. Zato smo prag reverzibilne elektroporacije definirali nekoliko drugače (Slika 2.3).

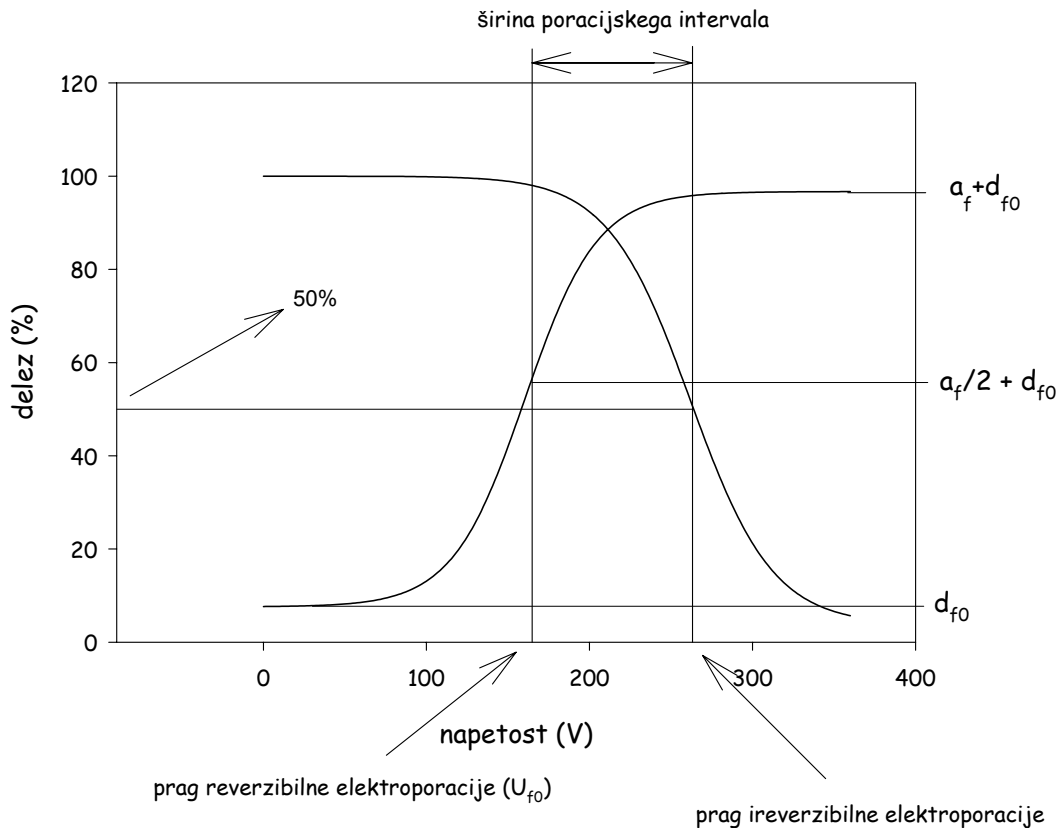
Definicija 2: PRAG REVERZIBILNE ELEKTROPORACIJE

Prag reverzibilne elektroporacije pri izpostavitvi celic pulzom visoke napetosti je tista napetost, pri kateri sigmoidna krivulja, ki opisuje delež fluorescirajočih celic v populaciji, doseže 50% razlike med njeno največjo in najmanjšo vrednostjo.

Definicija 3: ŠIRINA ELEKTROPORACIJSKEGA INTERVALA

Širina elektroporacijskega intervala je razlika med pragom ireverzibilne elektroporacije in pragom reverzibilne elektroporacije.

Osnova definicij pragu reverzibilne elektroporacije in širine elektroporacijskega intervala je elektropermeabilizacija celic s propidijevim jodidom. Struktura molekule propidijevega jodida, njena molekulska masa in naboj se razlikuje od strukture, molekulske mase in naboja preostalih testnih molekul (tabela 1.1 v Uvodu) in molekul, s katerimi bi želeli celice permeabilizirati. Vrednosti obeh parametrov so zato ob permeabilizaciji enakih celic z drugačnimi molekulami lahko drugačne.



Slika 2.3. Prag reverzibilne elektroporacije, prag ireverzibilne elektroporacije in širina poracijskega intervala.

2.1.6 Določitev deleža živih, uspešno permeabiliziranih celic

Meritvi preživetja celic in vnosa fluorescentnega barvila sta ločena eksperimenta. Med živimi celicami v opazovani populaciji so tako tiste, ki so pri izbrani napetosti permeabilizirane, kot tudi tiste, ki niso. Prav tako so med fluorescentnimi celicami pri izbrani napetosti tiste, ki jih permeabilizacija ni trajno poškodovala, kot tudi tiste, ki jih je. Kako torej vemo koliko celic v opazovani populaciji je živih in uspešno permeabiliziranih hkrati?

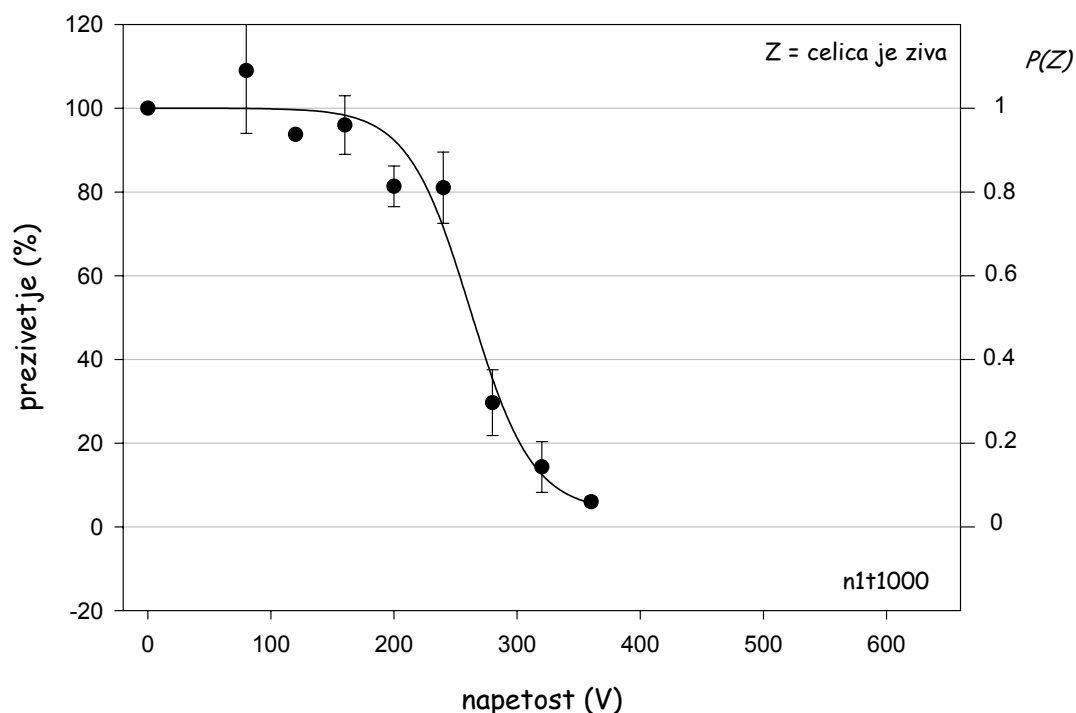
Naj bo poskus izpostavitve celic izbranim električnim parametrom pri določeni napetosti (preživetje celic). Dogodek Z v poskusu naj se zgodi, kadar celica tretma preživi:

$$Z = \text{celica preživi} . \quad (3)$$

Relativna frekvenca dogodka $Z f(Z)$ je enaka deležu preživetja, kot smo ga definirali v podglavju 1.3:

$$f(Z) = \frac{\text{število živih celic}}{\text{število vseh celic}} . \quad (4)$$

Denimo, da opazujemo tako veliko število celic, da je relativna frekvenca $f(Z)$ kar enaka verjetnosti $P(Z)$. Sigmoidna krivulja, ki opisuje delež živih celic v populaciji v odvisnosti od napetosti, torej pri vsaki napetosti podaja verjetnost, da celica ostane živa (slika 2.4).



Slika 2.4. Sigmoidna krivulja, ki opisuje delež živih celic v populaciji v odvisnosti od napetosti. Celice DC3F smo izpostavili enemu napetostnemu pulzu dolžine 1000 μ s. Hkrati krivulja opisuje verjetnost dogodka $P(Z) = P(\text{celica preživi})$.

Drugi poskus naj bo elektropermeabilizacija celic s propidijevim jodidom z izbranimi električnimi parametri pri določeni napetosti. Dogodek B v tem poskusu naj se zgodi, kadar celica fluorescira:

$$B = \text{celica fluorescira} . \quad (5)$$

Relativna frekvenca dogodka B $f(B)$ je enaka deležu permeabiliziranih celic, kot smo ga definirali v podpoglavju 2.1.4:

$$f(B) = \frac{\text{število fluorescentnih celic}}{\text{število vseh celic}} . \quad (6)$$

Denimo, da opazujemo tako veliko število celic, da je relativna frekvenca $f(B)$ kar enaka verjetnosti $P(B)$. Sigmoidna krivulja, ki opisuje delež permeabiliziranih celic v populaciji v odvisnosti od napetosti, torej pri vsaki napetosti podaja verjetnost, da celica po terapiji s pulzi te napetosti fluorescira.

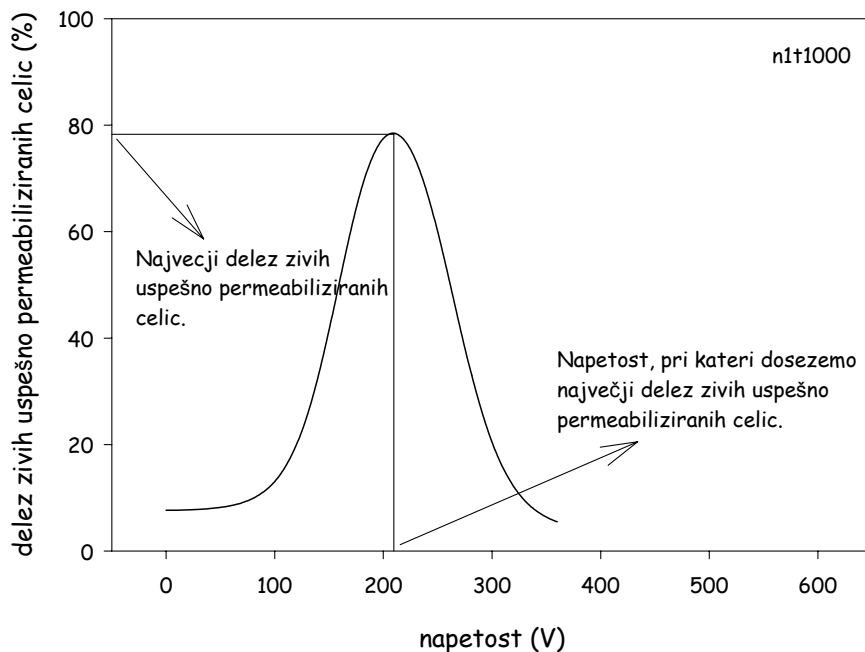
Naj se dogodek ZB zgodi tedaj, kadar pri izbranih električnih parametrih in določeni napetosti celica fluorescira in hkrati ostane živa:

$$ZB = \text{celica fluorescira in hkrati preživi} \quad (7)$$

Edina razlika v pogojih prvega in drugega poskusa je, da so v okolici celic v drugem poskusu prisotne tudi molekule propidijevega jodida. Če to razliko v obeh poskusih zanemarimo, lahko zapišemo verjetnost dogodka ZB kot produkt verjetnosti dogodka Z in verjetnosti dogodka B :

$$P(ZB) = P(Z) P(B) \quad (8)$$

Z množenjem vrednosti na sigmoidni krivulji, ki opisuje delež živih celic v populaciji, z vrednostmi na sigmoidni krivulji, ki opisuje delež fluorescirajočih celic v populaciji, dobimo krivuljo, ki opisuje delež živih in uspešno permeabiliziranih celic v populaciji (slika 2.5).



Slika 2.5. Delež živih in uspešno permeabiliziranih celic v odvisnosti od napetosti električnih pulzov. Celice DC3F smo izpostavili enemu napetostnemu pulzu dolžine 1000 ms.

2.1.7 Obdelava eksperimentalno dobljenih podatkov

Namen naše študije je bil analizirati vpliv različnih električnih parametrov na elektroporacijo celic v pogojih *in vitro*. Za vsak opazovani protokol izpostavitve celic pulzom visoke napetosti, tj. izbrano število napetostnih pulzov, izbrano trajanje pulzov v vlaknu in izbrano frekvenco pulzov, smo določili preživetje celic in

fluorescenco z napetostnimi pulzi vnešenega propidijevega jodida pri različnih amplitudah električnih pulzov, tj. pri različnih napetostih.

Delež preživelih celic in delež fluorescirajočih celic pri opazovanem protokolu in amplitudi električnih pulzov smo določili na podlagi treh, štirih ali petih poskusov. Za vsako napetost smo izračunali povprečni vrednosti obeh deležev in kvadratni odmik izmerkov od izračunanih povprečnih vrednosti (varianco). Rezultati, tj. povprečne vrednosti s standardnimi napakami, vseh opazovanih protokolov so zbrani v Dodatku.

Vsem izmerjenim vrednostim (vsaj tri meritve pri vsaki amplitudi) pri izbranem protokolu smo z metodo najmanjših kvadratov prilagodili sigmoidno krivuljo. Upoštevali smo omejitve, ki smo jih navedli v podpoglavju 2.1.5. Krivulje smo prilagodili s programskim paketom *SigmaPlot 4.0*. Vse krivulje in njihovi parametri so zbrani v Dodatku.

Določili smo vsoto kvadratov odklikov izmerkov od krivulje (*SEE*)

$$SEE = \sum_i (y_i - y_{iP})^2, \quad (9)$$

kjer je y_i izmerjena vrednost, y_{iP} pa vrednost na prilagojeni krivulji. Povprečni kvadratni odmik izmerkov od krivulje s^2 zaradi predstavitve meritev z modelom, smo izračunali kot [22]:

$$s^2 = \frac{SEE}{n - (k + 1)}. \quad (10)$$

V enačbi je n označeno število vseh meritev, na podlagi katerih smo določili krivuljo, $k+1$ pa je število parametrov prilagojene krivulje.

Prag reverzibilne elektroporacije pri izpostavitvi celic pulzom visoke napetosti smo definirali kot tisto napetost, pri kateri sigmoidna krivulja, ki opisuje delež fluorescirajočih celic v vzorcu, doseže 50% razlike med njeno največjo in najmanjšo vrednostjo; prag ireverzibilne elektroporacije pa kot napetost, pri kateri sigmoidna krivulja, ki opisuje delež živih celic v vzorcu, doseže vrednost 50%. Obe napetosti torej razberemo iz linearnega dela sigmoidne krivulje. Povprečni odmik od izračunane vrednosti napetosti s_U smo ocenili z diferencialom d' pri izbrani vrednosti sigmoidne krivulje [45]:

$$s_U = \frac{1}{d'} s. \quad (11)$$

Varianco vrednosti elektroporacijskega intervala, ki smo ga definirali kot razliko praga reverzibilne in praga ireverzibilne elektroporacije, smo ocenili z vsoto varianc obeh pragov.

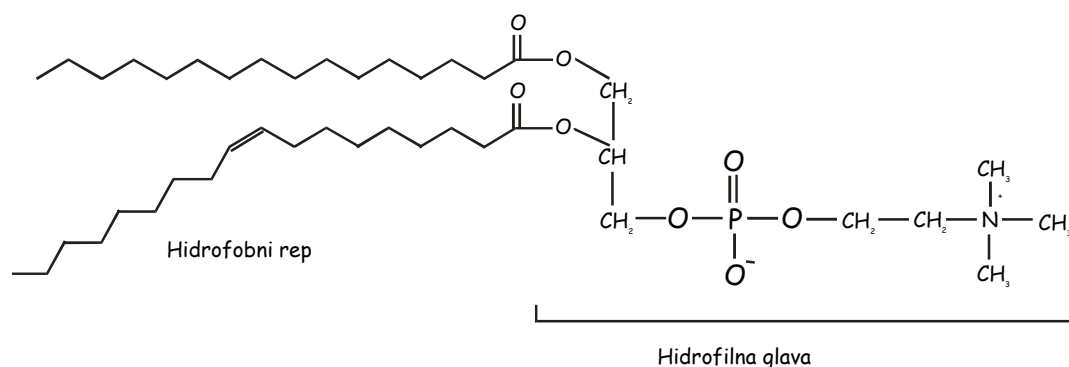
Varianco deleža živih, uspešno permeabiliziranih celic, in varianco napetosti, pri kateri ta delež dosežemo, pa smo ocenili z večjo od obeh, z diferencialom določenih varianc.

2.2 Poskusi na lipidnih dvoslojih

Vsi poskusi na planarnih lipidnih dvoslojih so bili narejeni na Johns Hopkins University, Baltimore v ZDA v okviru študentske izmenjave med Univerzo v Ljubljani in Johns Hopkins University v letih 1997 in 1998. Uporabili smo eksperimentalni protokol in eksperimentalni sistem, ki je natančneje opisan v Troiano et al. [106] in Sharma et al [100].

2.2.1 Priprava planarnega lipidnega dvosloja

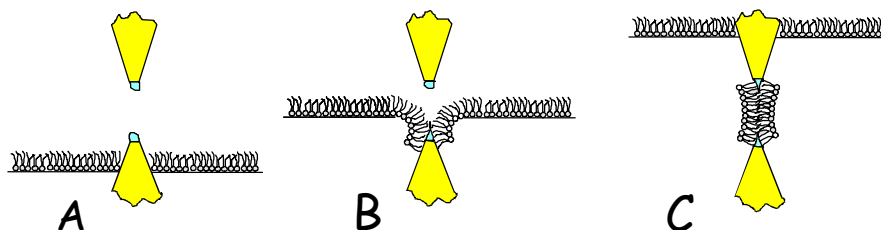
Planarne lipidne dvosloje smo tvorili iz umetnega lipida 1 –pamitol 2 –oleol fosfatidiholina (POPC) (slika 2.6), ki smo ga v obliki parhu kupili pri Avanti Polar Lipids, Alabaster, ZDA in ga raztopili v mešanici hexana in etanola (razmerje 9:1) tako, da je 1 ml omenjene mešanice vseboval 10 mg POPC. Molekule fosfatidiholina so prisotne v kopici bioloških membran. Zelo velik je na primer delež tega fosfolipida v membranah endoplazmatskega retikuluma in mitohondrijev (okrog 40%) [10].



Slika 2.6. Zgradba molekule POPC. Dve –OH skupini glicerola sta zaestreni z maščobnima kislinama, ki tvorita hidrofobna repa molekule. Hidrofilno glavo molekule pa sestavlja preostala –OH skupina, ki je zaestrena s fosforjevo kislino, nanjo pa je vezana organska baza holin.

Lipidne dvosloje smo tvorili po Montal – Müllerjevem principu [57] (slika 2.7). Uporabili smo posodo iz teflona, ki je bila predeljena v dva razdelka velikosti 1,5 cm³. V steno med razdelkoma smo vstavili 25 μm debelo teflonsko folijo, v kateri je bila okrogla luknjica s premerom 105 μm. Površina luknjice je znašala 8,66 10⁵ cm² [106].

Teflonsko posodo smo med eksperimenti potopili v žvepleno kislino (H₂SO₄), ki jo je dobro očistila. Pred eksperimentom smo jo sprali z destilirano vodo in počakali, da se je posušila. Teflonsko folijo smo med eksperimenti hranili v kloroformu. Pred eksperimentom smo jo vzeli iz posode s kloroformom in počakali, da se posuši. Po eksperimentu pa smo jo najprej oprali z etanolom, nato z destilirano vodo ter suho položili v posodo s kloroformom. Uporabili smo dva para Ag-AgCl elektrod (IVM, ZDA), ki smo jih obesili nad teflonsko posodo tako, da sta bili v vsakem predelku dve (slika 2.8). Po vsakem eksperimentu smo elektrode sprali z etanolom in destilirano vodo. Med eksperimenti smo jih hranili v zračnem in temnem prostoru.

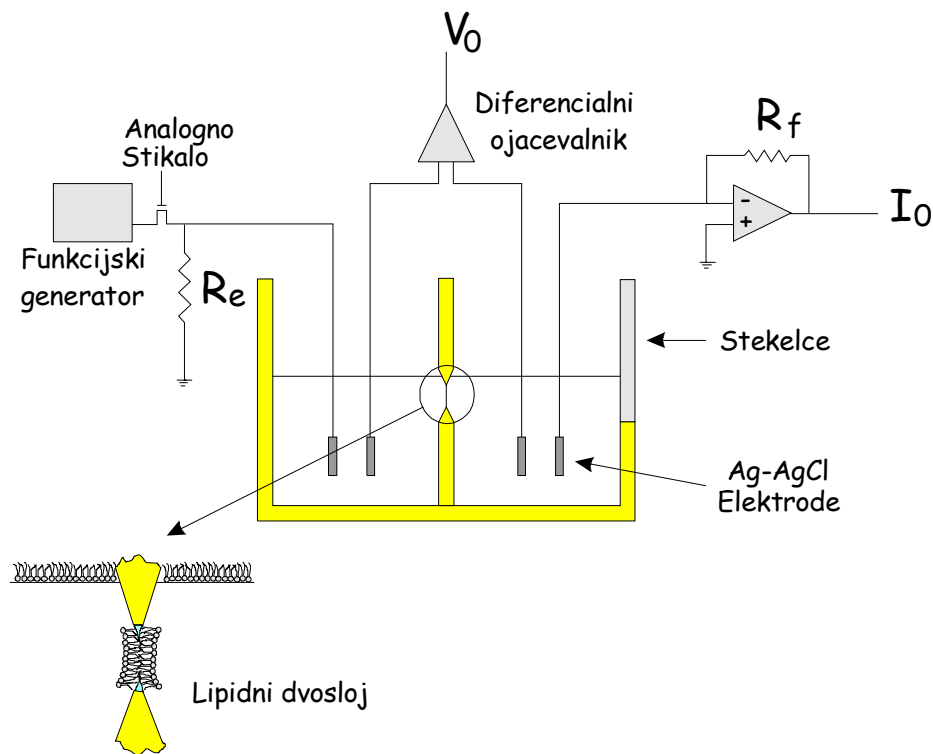


Slika 2.7. Montal – Müllerjev princip tvorbe lipidnih dvoslojev. A) Enojna plast lipidnih molekul na površini raztopine soli. B) Nivoja slane raztopine v obeh predelkih počasi in kar se le da sočasno dvignemo nad zgornji rob luknjice v predelni steni. C) Na luknjici ostane dvosloj lipidnih molekul. Sliko smo narisali po sliki v Ehrlich 92.

Pred vsakim eksperimentom smo suho teflonsko folijo vstavili v predelno steno teflonske posode. Na obe strani luknjice smo kanili 1 μl raztopine lipida. To omogoča nastanek bolj stabilnih dvoslojev. Ko je raztopina lipida povsem izhlapela, smo na obe strani luknjice kanili 1,5 μl mešanice heksdekana in pentana v razmerju 3 : 7. V oba predelka posode smo nalili raztopino soli (100 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.40) ravno do spodnjega roba luknjice. Na gladino raztopine soli v vsakem predelku smo kanili 2 μl raztopine lipida in počakali, da se raztopina lipida razporedi po celotni gladini predelka (vsaj 15 min). Lipidni dvosloj smo naredili tako, da smo nivoja slane raztopine v obeh predelkih počasi in kar se le da sočasno dvignili nad zgornji rob luknjice v predelni steni (slika 2.7B). Potem, ko smo lipidni dvosloj z elektroporacijo porušili, smo nivoja slane raztopine spet spustili pod luknjico in lipidni dvosloj ponovno zgradili po opisanem postopku.

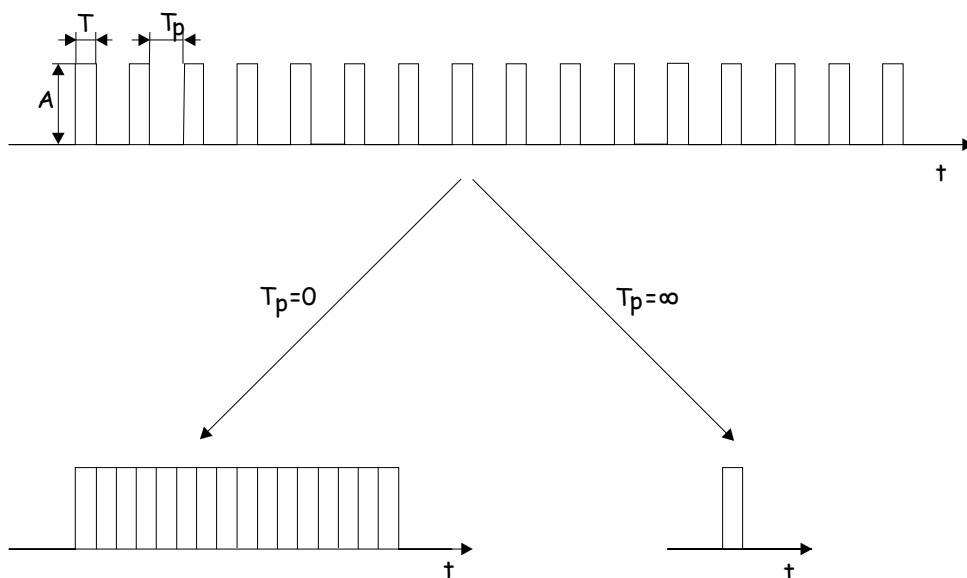
4.2.2 Meritev porušitvene napetosti

Električne pulze smo aplicirali s parom Ag-AgCl elektrod preko hitrega nizko nabojskega analognega stikala [100] z nizko upornostjo ob vklopu in visoko upornostjo ob izklopu. Nizka upornost ob vklopu je omogočala hitro nabijanje lipidnega dvosloja (<10 ns). Visoka opornost ob izklopu pa je izolirala lipidni dvosloj od vira napetosti, tako da smo razelektritev lipidnega dvosloja lahko opazovali na zunanjem upor R_e (1 M Ω). Drugi par elektrod (Ag-AgCl) je služil merjenju napetosti na lipidnem dvosloju (slika 7). Vir napetosti je predstavljalo programabilno vezje za oblikovanje pulzov različnih oblik WSB100 (Quatech Inc, Akron, ZDA), ki smo ga upravljali preko računalnika. Napetost na membrani in tok skozi membrano smo spremljali na spominskem osciloskopu (Tektronix 2211), podatke pa s programom Labview shranjevali v računalniku. Temperatura prostora, v katerem smo meritve opravljali, je bila 18°C.



Slika 2.8. Preprosta shema eksperimentalnega sistema. V pregradi med predelkoma teflonske posode je vstavljena teflonska folija z luknjico na kateri smo gradili lipidne dvosloje. V raztopino soli so potopljene štiri elektrode. S srednjima dvema smo merili napetost na lipidnem dvosloju (V_0) preko diferencialnega ojačevalnika z visoko impedanco, z zunanjsima dvema pa smo na lipidni dvosloj privedli pulze ustrezne napetosti in merili tok (I_0) skozi lipidni dvosloj. Analogno stikalo prekine povezavo med lipidnim dvoslojem in napetostnim virom, tako da se lipidni dvosloj lahko razelektri le preko zunanjega upora R_e ($1\text{ M}\Omega$). Sliko smo povzeli po sliki v Sharma et al 1996 [100].

Pred vsakim poskusom smo nekajkrat izmerili kapacitivnost celotnega sistema brez lipidnega dvosloja (C_s), tj. kapacitivnost vezja, teflonske posode in teflonske folije. Sistem smo izpostavili $10\ \mu\text{s}$ trajajočemu pulzu z amplitudo 300 mV in ga razelektrili preko zunanje upornosti R_e . Kapacitivnost sistema smo izračunali iz časovne konstante razelektritve. Na isti način smo za vsak lipidni dvosloj izmerili kapacitivnost sistema skupaj z lipidnim dvoslojem (C_t). Kapacitivnost lipidnega dvosloja (C_m) smo izračunali kot razliko med obema kapacitivnostima ($C_m = C_t - C_s$). Privzeli smo, da lipidni dvosloj zavzema 90% površine luknjice; torus, na katerega lipidni dvosloj napnemo pa 10% luknjice. Iz znane površine lipidnega dvosloja in njegove kapacitivnosti, smo izračunali specifično kapacitivnost vsakega lipidnega dvosloja. Enaka specifična kapacitivnost je bila merilo ponovljivosti lipidnih dvoslojev.



Slika 2.9. Vlak šestnajstih pulzov dolžine T ($100 \mu\text{s}$). Pavzo med pulzi T_p smo s faktorjem 10 povečevali od $1 \mu\text{s}$ do $1000 \mu\text{s}$. Pulz dolžine $1600 \mu\text{s}$ nam je predstavljal pavzo med pulzi, ki traja $0 \mu\text{s}$. Pulz dolžine $100 \mu\text{s}$ pa vlak šestnajstih pulzov, v katerem je pavza med pulzi neskončno dolga. Amplituda pulzov v vlaku je označena z A .

Lipidne dvosloje smo po testu stabilnosti (lipidni dvosloj mora biti obstojen vsaj 5 min) izpostavili vlaklu šestnajstih pulzov dolžine $100 \mu\text{s}$ (slika 2.9). Pavzo med pulzi smo s faktorjem 10 povečevali od $1 \mu\text{s}$ do $1000 \mu\text{s}$. Pulz dolžine $1600 \mu\text{s}$ nam je predstavljal pavzo med pulzi, ki traja $0 \mu\text{s}$. Pulz dolžine $100 \mu\text{s}$ pa vlak šestnajstih pulzov, v katerem je pavza med pulzi neskončno dolga. Amplitudo napetosti, kateri je bil izpostavljen lipidni dvosloj, smo s korakom 10 mV dvigovali od napetosti, ki po izkušnjah še ni porušila lipidnega dvosloja, do porušitvene napetosti. Napetost, pri kateri se je lipidni dvosloj porušil, smo zapisali kot elektroporacijsko napetost lipidnega dvosloja. Zapisali smo tudi zaporedno številko pulza, v katerem je do porušitve prišlo. Pri vsaki pavzi med pulzi smo izvedli šest do osem meritev porušitvene napetosti lipidnega dvosloja.

2.2.3 Statistična analiza

Rezultate meritev smo analizirali z Mann – Whitneyevim testom. Je neparametričen in primeren za majhne vzorce [16]. Ničelno hipotezo nam je predstavljala trditev, da vzorca, ki smo ju med seboj primerjali (vse meritve pri določeni pavzi me pulzi), izhajata iz iste populacije. Ničelno hipotezo smo zavrnil, če je bila njena verjetnost manjša od $0,05$.

3. REZULTATI

3.1 Vpliv električne energije na elektroporacijo v pogojih *in vitro*

Izbrali smo pet protokolov, v katerih smo celični suspenziji med poskusom dovedli enako električno energijo E ; število pulzov N , trajanje enega pulza T_i in frekvenca pulzov f pa so se od protokola do protokola razlikovali (slika 3.1).

Električno energijo E , ki jo med eksperimentom dovedemo celični suspenziji izračunamo kot:

$$E = \int_0^{\tau} U(t)I(t)dt = \int_0^{\tau} U(t) \frac{U(t)}{Z(\omega, t)} dt = \frac{1}{Z} \int_0^{\tau} U(t)^2 dt \quad . \quad (12)$$

Napetost med elektrodama smo označili z $U(t)$, električni tok $I(t)$ in trajanje celotnega poskusa s τ . Privzeli smo, da je impedanca bremena $Z(\omega, t)$ omska in med tretmajem konstantna. Zapisali smo jo s konstanto Z . Tudi napetost $U(t)$ je bila med pravokotnim pulzom konstantna in enaka U . Naštete ugotovitve upoštevamo v enačbi (1) in dobimo:

$$E = \frac{U^2}{Z} \sum_{i=1}^N T_i = \frac{1}{Z} U^2 \tau \quad . \quad (13)$$

Pri opisanih eksperimentalnih protokolih energijo protokola torej določata napetost pulzov U in trajanje celotnega poskusa τ .

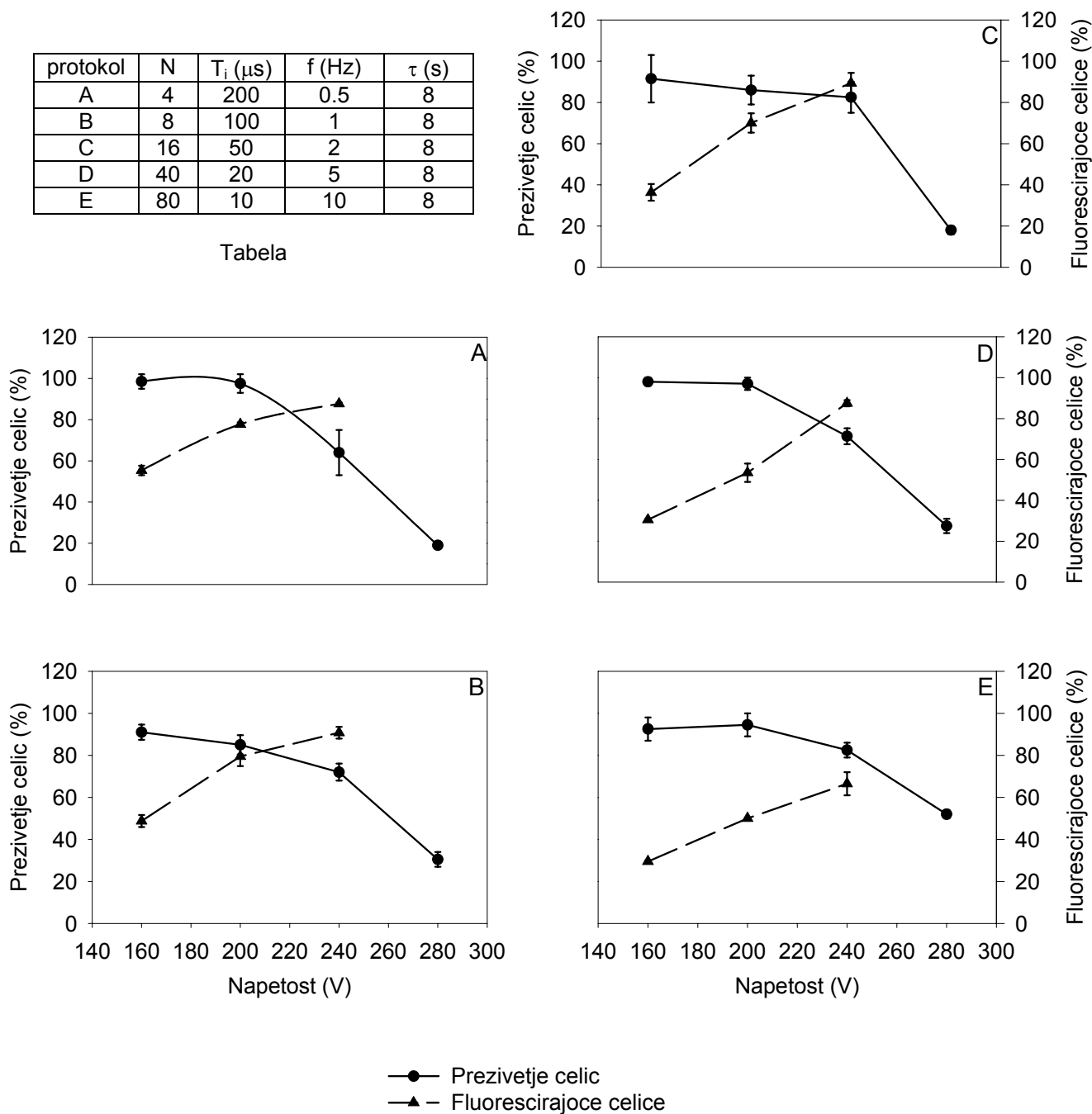
Permeabilizacijo celic smo v okviru vseh petih protokolov spremljali z merjenjem fluorescence med elektroporacijo vnešenega propidijevega jodida in merjenjem preživetja celic po elektroporaciji pri treh različnih električnih energijah, ki so jih določale napetosti 160 V, 200 V in 240 V. Preživetje celic po elektroporaciji smo pri vseh petih protokolih določili tudi pri energiji, ki jo določa napetost 280 V.

Ugotovili smo, da elektroporacija celic z napetostmi do vključno 200 V v obliki kateregakoli od petih protokolov ne vpliva bistveno na njihovo preživetje, saj le-to znaša približno 90 % preživetja celic v kontrolni skupini (slika 3.1). Višji napetosti (240 V in 280 V) pa vplivata na preživetje celic. Le to se z višanjem napetosti zmanjšuje. Pri obeh napetostih ostane delež živih celic večji pri izpostavitvi celic električnim pulzom v okviru protokolov D in E, kjer je trajanje pulzov krajše, frekvenca pulzov višja in število pulzov večje. Tako pri izpostavitvi celic pulzom napetost 280 V v okviru protokola E, ostane živih kar 52% celic, v okviru protokola A pa le 20%.

Delež uspešno permeabiliziranih celic z naraščajočo napetostjo (energijo) narašča v okviru vseh petih protokolov (slika 3.1). Delež uspešno permeabiliziranih celic pa ni odvisen le od napetosti (energije), temveč tudi od uporabljenega protokola. Pri vseh treh opazovanih energijah je namreč delež uspešno permeabiliziranih celic večji pri

protokol	N	T_i (μ s)	f (Hz)	τ (s)
A	4	200	0.5	8
B	8	100	1	8
C	16	50	2	8
D	40	20	5	8
E	80	10	10	8

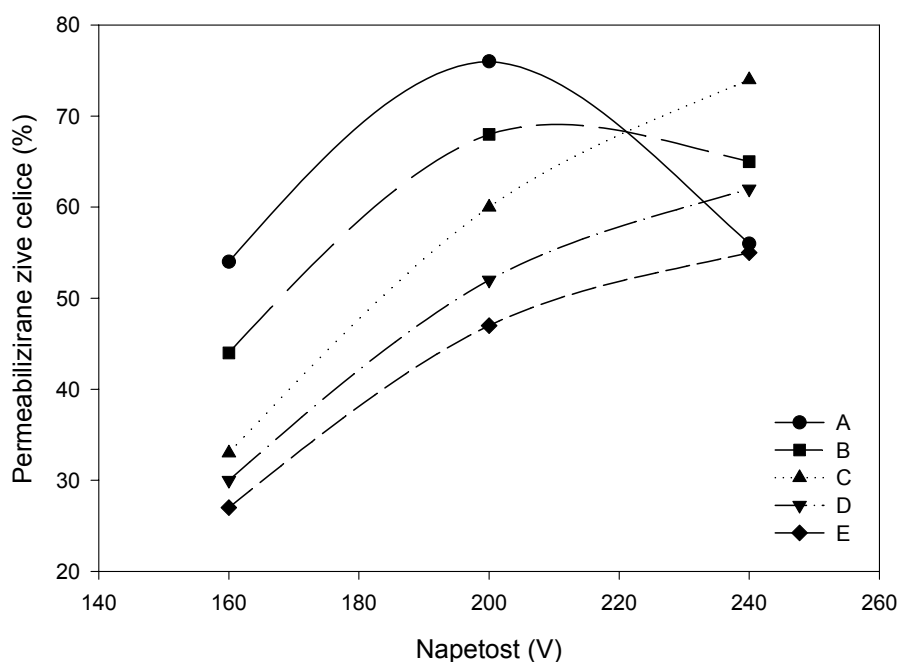
Tabela



Slika 3.1. Rezultati merjenja fluorescence med elektropermeabilizacijo vnešenega propidijevega jodida in merjenja preživetja celic po elektroporaciji pri električnih parametrih, ki jih določajo v tabeli navedeni protokoli.

režimih A in B, kjer so pulzi daljši, njihovo število manjše, frekvenca pa nižja. Pri napetosti 200 V je v okviru protokola A uspešno permeabiliziranih kar 78 % celic v opazovani populaciji; v okviru protokola E pa le 50 %.

Določili smo tudi delež živih uspešno permeabiliziranih celic v populaciji v okviru vseh petih elektroporacijskih protokolov in pri vseh treh napetostih (energijah). Delež živih uspešno permeabiliziranih celic je odvisen od uporabljenega protokola (slika 3.2). Pri napetostih (energijah), kjer preživetje celic še ni zmanjšano (160 V in 200 V), je delež živih uspešno permeabiliziranih celic pri izbrani energiji tem večji, čim daljše je trajanje pulzov. Pri napetostih, ki že vplivajo na preživetje celic pa temu ni več tako. Pri napetosti 240 V smo največji delež živih uspešno permeabiliziranih celic ocenili v okviru protokola C (16 pulzov dolžine 50 μ s; frekvenca 2 Hz). Protokola z najdaljšimi in najkrajšimi pulzi – A in E pa sta si enakovredna.



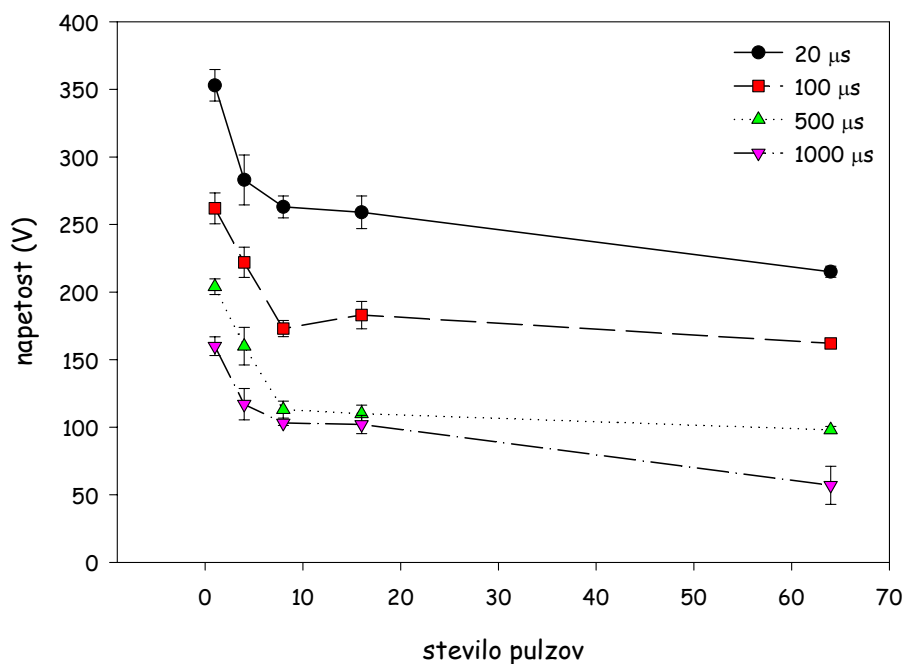
Slika 3.2. Delež živih uspešno permeabiliziranih celic v opazovani populaciji v odvisnosti od napetosti. Električni parametri protokolov A, B, C, D in E so navedeni v Tabeli na sliki 3.1.

3.2 Prag reverzibilne elektroporacije

Preučevali smo vpliv števila pravokotnih električnih pulzov in trajanja električnih pulzov na prag reverzibilne elektroporacije. Prag reverzibilne elektroporacije smo določili na podlagi merjenja fluorescence med elektropermeabilizacijo vnesenega propidijevega jodida. Napetost, pri kateri sigmoidna krivulja, ki opisuje delež fluorescirajočih celic v populaciji, doseže 50% razlike med njeno največjo in najmanjšo vrednostjo, smo označili kot pragovno napetost reverzibilne elektroporacije.

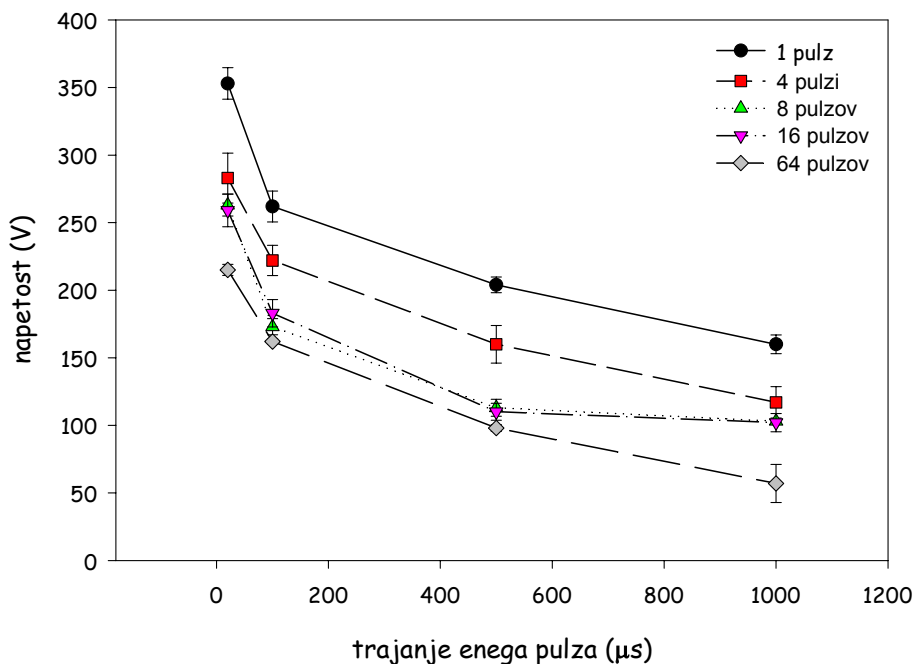
Določili smo pragovno napetost reverzibilne elektroporacije pri enem pulzu in vlakih štirih, osmih, šestnajstih in štiriinšestdesetih pulzov. Pulzi v vlakcu so si sledili s

frekvenco 1 Hz. Trajanje posameznega pulza v vlakcu je bilo 20 μs , 100 μs , 500 μs oziroma 1000 μs . Pragovna napetost reverzibilne elektroporacije upada z večanjem števila pulzov. Upadanje je znatno do števila osem; nadaljnje povečevanje števila pulzov v vlakcu pa ne prinese več njenega bistvenega znižanja (slika 3.3).



Slika 3.3. Pragovna napetost reverzibilne elektroporacije v odvisnosti od števila pulzov. Pragovne napetosti reverzibilne elektroporacije smo določili pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štiriinšestdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Vsaka točka je izračunana iz ustrezne sigmoidne krivulje; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

Tudi daljšanje trajanja pulzov v vlakcu znižuje pragovno napetost reverzibilne poracije (slika 3.4). Najdaljši pulzi, ki smo jih opazovali v vlakih z različnim številom pulzov, so trajali 1 ms. Na osnovi izmerjenih vrednosti sklepamo, da bi z daljšimi pulzi lahko dodatno znižali pragovno napetost reverzibilne elektroporacije. Z namenom, da bi poiskali pragovno napetost reverzibilne elektroporacije z enim, poljubno dolgim pulzom, ki predstavlja nekakšno merilo vzdražljivosti celic DC3F pri elektroporaciji s propidijevim jodidom. Upadanje zelo dobro opisuje vsota dveh eksponentno padajočih krivulj oblike: $y = y_0 + ae^{-bx} + ce^{-dx}$, saj izmerjene točke od krivulje sploh ne odstopajo. Pragovna napetost reverzibilne elektroporacije, izračunana z opisanim modelom, znaša 98 V. To je ocena najnižje napetosti, s katero lahko elektropermeabiliziramo celice DC3F s propidijevim jodidom.



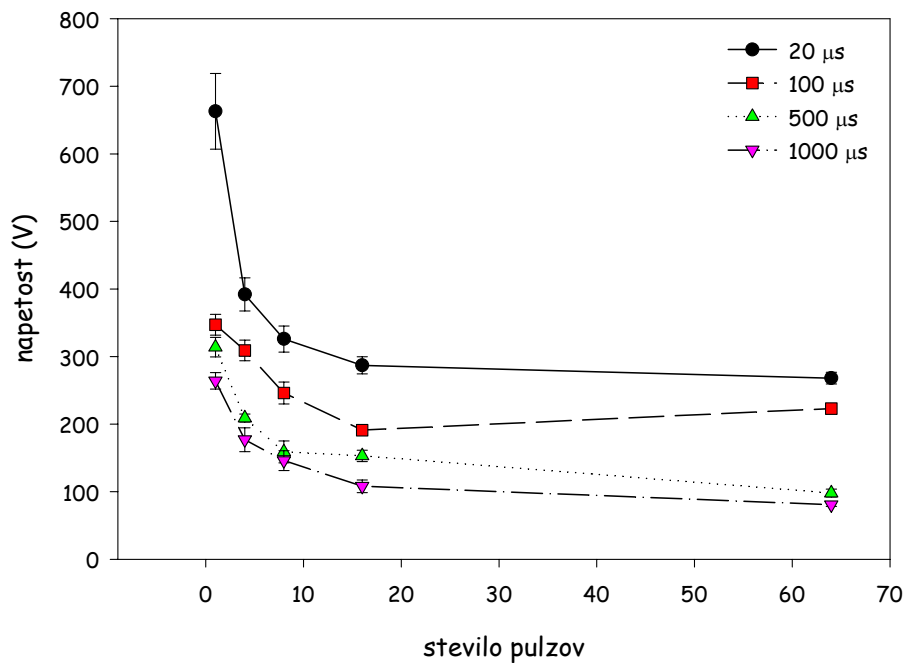
Slika 3.4. Pragovna napetost reverzibilne elektroporacije v odvisnosti od trajanja pulzov. Pragovne napetosti reverzibilne elektroporacije smo določili pri vlakih pulzov dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Vlaki so vsebovali enega, štiri, osem, šestnajst ali štiriinšestdeset pulzov. Vsaka točka je izračunana iz ustrezne sigmoidne krivulje; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

3.3 Prag ireverzibilne elektroporacije

Vpliv števila pravokotnih električnih pulzov in trajanja električnih pulzov na prag ireverzibilne elektroporacije smo določili z merjenjem preživetja celic po elektroporaciji. Napetost, pri kateri je v opazovani populaciji osalo živih le še 50 % celic, smo označili kot pragovno napetost ireverzibilne elektroporacije.

Določili smo pragovno napetost ireverzibilne elektroporacije pri enem pulzu in vlakih štirih, osmih, šestnajstih in štiriinšestdesetih pulzov. Pulzi v vlakcu so si sledili s frekvenco 1 Hz. Trajanje posameznega pulza v vlakcu je bilo 20 μs , 100 μs , 500 μs oziroma 1000 μs . Tudi pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije upada z večanjem števila pulzov; plato doseže pri šestnajstih pulzih; nadaljnje povečevanje števila pulzov v vlakcu ne prinese več njenega bistvenega znižanja (slika 3.5).

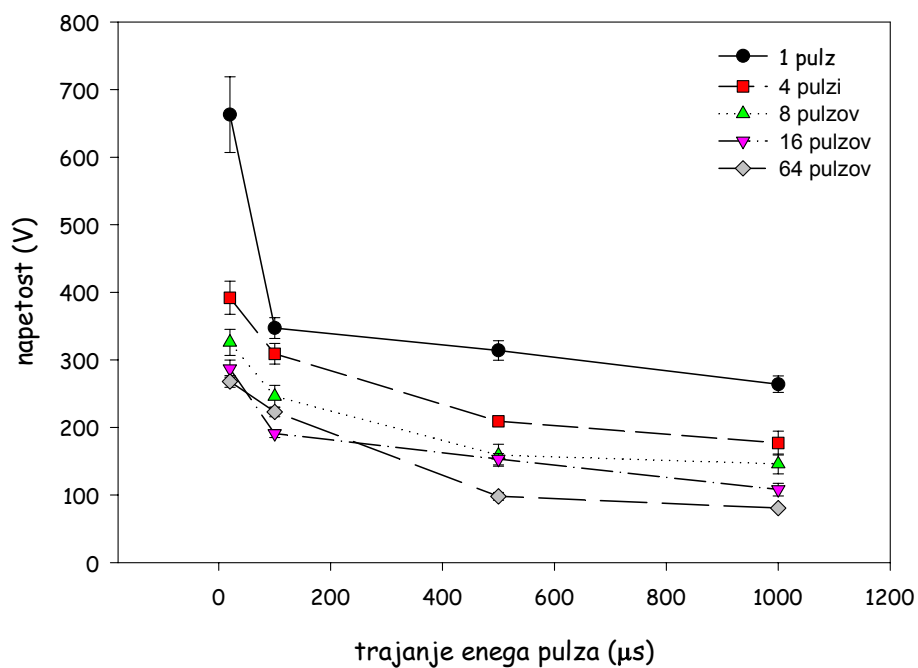
Tudi daljšanje trajanja pulzov v vlakcu znižuje pragovno napetost ireverzibilne elektroporacije (slika 3.6). Iz poteka krivulj lahko sklepamo, da bi z daljšimi pulzi v vlakcu lahko še nekoliko znižali pragovno napetost ireverzibilne elektroporacije.



Slika 3.5. Pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije v odvisnosti od števila pulzov (zgoraj).

Slika 3.6. Pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije v odvisnosti od trajanja pulzov (spodaj).

Pragovne napetosti ireverzibilne elektroporacije smo določili pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štiriinšestdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs, 100 μs, 500 μs in 1000 μs. Vsaka točka je izračunana iz ustrezne sigmoidne krivulje; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

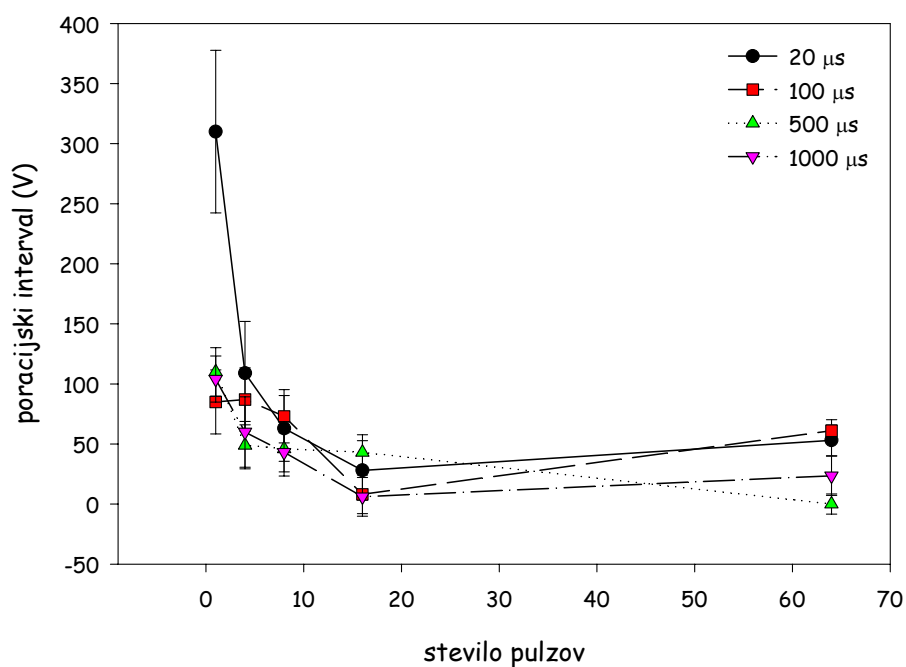


3.4 Širina elektroporacijskega intervala

Širino elektroporacijskega intervala smo definirali kot razliko med pragovno napetostjo ireverzibilne elektroporacije in pragovno napetostjo reverzibilne elektroporacije. Pogledali smo, kako je širina elektroporacijskega intervala odvisna od števila pulzov v vlakcu in njihovega trajanja. Širino elektroporacijskega intervala smo izračunali iz vrednosti pragov ireverzibilne in reverzibilne elektroporacije, ki smo jih določili v prejšnjih dveh podpoglavjih.

Elektroporacijski interval je najširši (310 V) pri enem pulzu dolžine 20 μs . Pri tem protokolu upada preživetje celic z napetostjo zelo počasi, zato je pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije visoka (664 V), elektroporacijski interval pa širok.

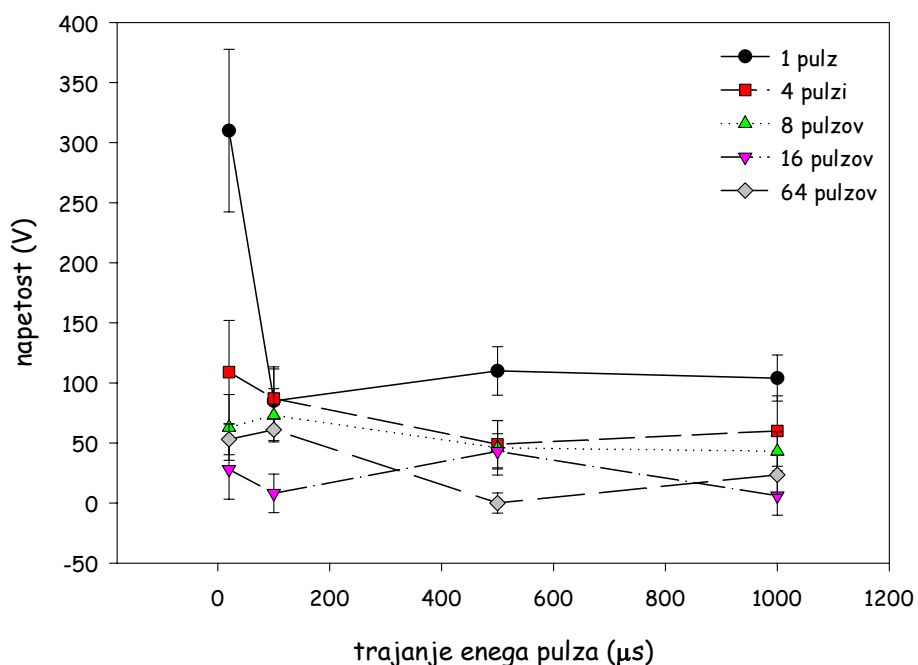
Najožji je elektroporacijski interval pri štiriinšestdesetih pulzih dolžine 500 μs . Pri tako izbranih parametrih sta pragovni napetosti ireverzibilne in reverzibilne elektroporacije enaki (98 V) in širina elektroporacijskega intervala je 0 V. Pri ostalih opazovanih kombinacijah električnih parametrov se širina poracijskega intervala giblje med 110 V (1 pulz dolžine 500 μs) in 6 V (16 pulzov dolžine 1000 μs).



Slika 3.7. Širina elektroporacijskega intervala v odvisnosti od števila pulzov. Določili smo jo pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štiriinšestdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Vsaka točka je izračunana na podlagi vsaj treh eksperimentov. Vsaka točka je izračunana iz dveh ustreznih sigmoidnih krivulj; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

Širina elektroporacijskega intervala se zmanjšuje z večanjem števila pulzov v vlakcu do šestnajstih pulzov. Pri šestnajstih pulzih je poracijski interval najožji pri vseh opazovanih dolžinah pulzov, razen pri pulzih dolžine 500 μs . Pri pulzih dolžine 20 μs znaša 28 V, pri 100 μs 8 V in pri 1000 μs 6 V. Nadaljnje povečevanje števila pulzov pa širine elektroporacijskega intervala bistveno ne spremeni (slika 3.7).

Sprememba dolžine pulzov v vlakcu ne vpliva znatno na širino elektroporacijskega intervala. Izjema je le en pulz dolžine 20 μs . Pri enem samem relativno kratkem pulzu kot je ta, se namreč preživetje celice z višanjem napetosti zmanjšuje zelo počasi – veliko počasneje kot pri izpostavitvi celic daljšim pulzom oziroma večjim številom le teh (slika 3.8).



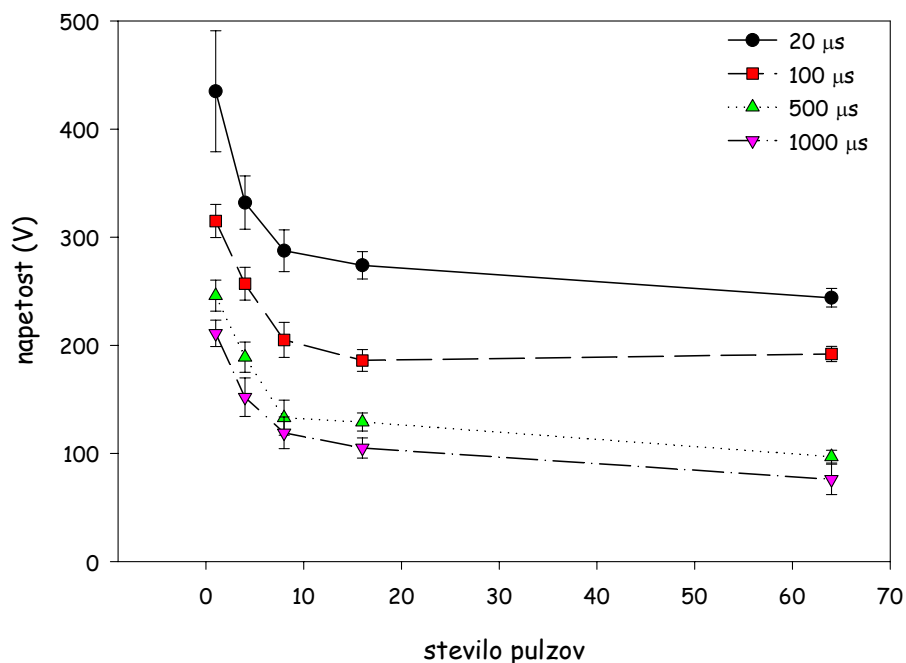
Slika 3.8. Širina elektroporacijskega intervala v odvisnosti od trajanja pulzov. Določili smo jo pri vlakih pulzov dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Vlaki so vsebovali enega, štiri, osem, šestnajst ali štiriinšestdeset pulzov. Vsaka točka je izračunana iz dveh ustreznih sigmoidnih krivulj; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

3.5 Žive, uspešno permeabilizirane celice

Na podlagi rezultatov meritev fluorescence med elektropermeabilizacijo vnešenega propidijevga jodida in meritev preživetja celic po elektroporaciji, smo določili največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic in napetost, pri kateri ga dosežemo.

Napetost, pri kateri dosežemo največji delež uspešno permeabiliziranih celic je odvisna tako od števila pulzov v vlakcu kot tudi od trajanja pulzov v vlakcu. Napetost

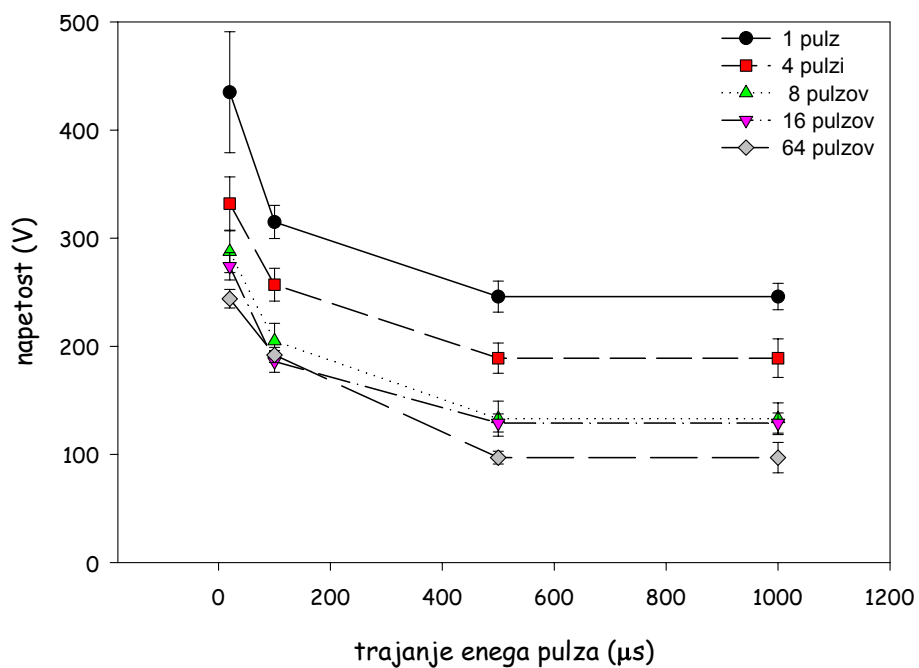
upada s številom pulzov. Do števila osem je upadanje znatno, nadaljnje povečanje števila pulzov v vlakcu pa ne prinese bistvenega znižanja napetosti (slika 3.9).



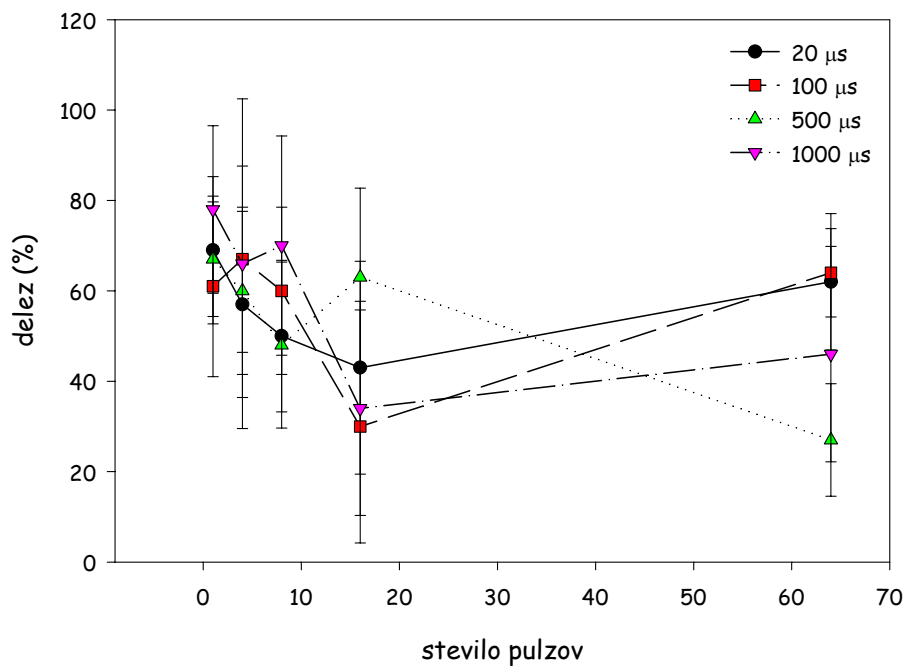
Slika 3.9. Napetost, pri kateri dosežemo največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic v odvisnosti od števila pulzov v vlakcu. Napetosti smo določili pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štirinšestdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Vsaka točka je izračunana iz dveh ustreznih sigmoidnih krivulj; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.

Napetost, pri kateri dosežemo največji delež živih uspešno permeabiliziranih celic upada tudi v odvisnosti od trajanja pulzov v vlakcu (slika 3.10). Do pulzov dolžine 500 μs je upadanje napetosti znatno. Podaljšanje trajanja posameznega pulza v vlakcu na 1 ms pa ne prinese več znatnega znižanja napetosti.

Največji delež uspešno permeabiliziranih celic je odvisen od uporabljenega števila pulzov in trajanja le teh. Izmed vseh opazovanih kombinacij števila pulzov in njihovega trajanja je bil največji delež živih uspešno permeabiliziranih celic največji pri enem 1 ms dolgem pulzu (78 % vseh celic v populaciji). Najnižjo vrednost pa je dosegel pri vlakcu štirinšestdesetih pulzov dolžine 500 μs , kjer je znašal le 27 % vseh celic v populaciji. Žal iz naših meritev ne moremo sklepati kakšna je odvisnost največjega deleža uspešno permeabiliziranih celic od števila pulzov v vlakcu oziroma od trajanja le teh (sliki 3.11 in 3.12). Pri tem nas ovira tudi znatna napaka, s katero so podatki obremenjeni. V ocenjenem povprečnem odmiku od izračunane vrednosti pri večini izračunanih točk se namreč nahaja večina preostalih izračunanih točk. Glede na natančnost naših meritev in prileganje krivulj, je delež živih, uspešno permeabiliziranih celic, v okviru vseh opazovanih protokolov približno enak.



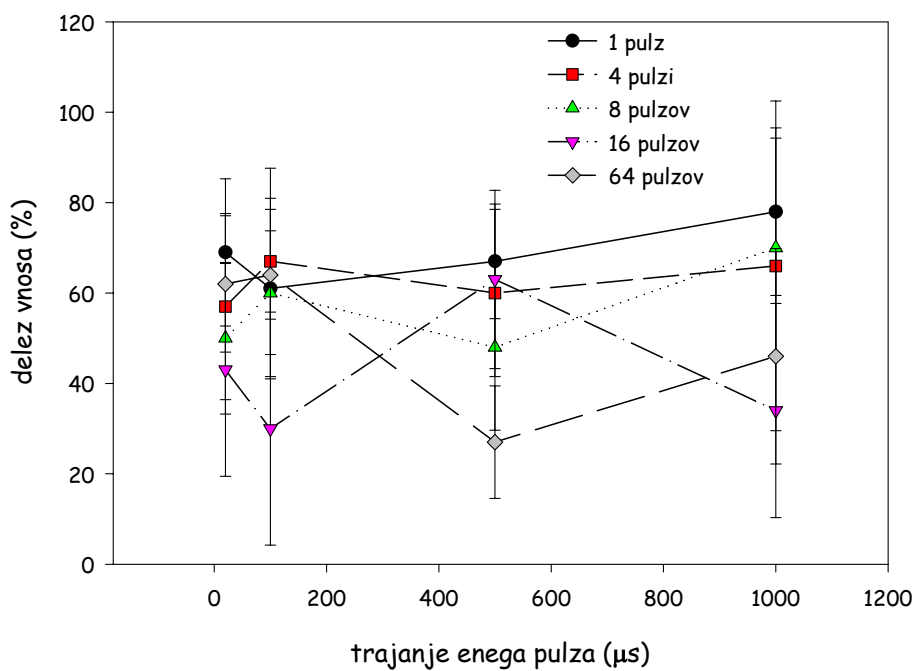
Slika 3.10. Napetost, pri kateri dosežemo največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic v odvisnosti od trajanja pulzov v vlakcu. Napetosti smo določili pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štirinajstdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs, 100 μs, 500 μs in 1000 μs. Vsaka točka je izračunana iz dveh ustreznih sigmoidnih krivulj; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.



Slika 3.11. Največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic v odvisnosti od števila pulzov v vlakcu (zgoraj).

Slika 3.12. Največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic v odvisnosti od trajanja pulzov v vlakcu (spodaj).

Določili smo ga pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štiriinšestdesetimi pulzi. Predstavljene so vrednosti za pulze dolžine 20 μs, 100 μs, 500 μs in 1000 μs. Vsaka točka je izračunana na podlagi vsaj treh eksperimentov. Vsaka točka je izračunana iz dveh ustreznih sigmoidnih krivulj; ocenjen je povprečni odmik od izračunane vrednosti.



3.6 Kriterijske funkcije

Končni cilj našega dela je določiti protokol elektroporacije, ki bo za željeno aplikacijo dal optimalne rezultate. S tem namenom smo v množico opisanih parametrov, s katerimi smo opisali elektroporacijo na celicah v pogojih *in vitro* vpeljali kriterijske funkcije. Definirali smo jih tako, da smo z njimi opisali zahteve željene aplikacije.

3.6.1 Elektrokemoterapija

Tretma celic, s katerim uspešno vnašamo kemoterapevtike v tumorsko tkivo, mora izpolnjevati sledeče zahteve:

- kemoterapevtik mora priti v notranjost čim večjega števila celic,
- ker je električno polje v tumorju in njegovi okolici nehomogeno [49], mora biti razlika med pragoma ireverzibilne in reverzibilne elektroporacije celic kar se le da velika,
- uporabljene napetosti naj bodo iz varnostnega stališča in stališča izdelave generatorjev visokonapetostnih pulzov čim nižje.

Zapišimo zgoraj navedene zahteve s parametri elektroporacije v pogojih *in vitro*, ki smo jih definirali:

- delež živih uspešno permeabiliziranih celic (D) mora biti čim višji,
- elektroporacijski interval (ΔU) naj bo čim širši,
- napetost, pri kateri dosežemo največji delež živih, uspešno permeabiliziranih celic (U_{max}) naj bo čim nižja.

Najpreprostejša kriterijska funkcija, ki izpolnjuje opisane tri zahteve je:

$$f = \frac{U_{max}}{D \Delta U} \quad (14)$$

Iščemo njen minimum. V tabeli 3.1 so navedene vrednosti kriterijske funkcije f za en pulz in vlake s štirimi, osmimi, šestnajstimi in štiriinšestdesetimi pulzi dolžine 20 μ s, 100 μ s, 500 μ s in 1000 μ s. Krepko je zapisana najmanjša vrednost kriterijske funkcije $f = 0,020$. En pulz dolžine 20 μ s torej glede na zapisano kriterijsko funkcijo predstavlja najbolj ugoden protokol elektroporacije.

Rezultat ni presenetljiv. Ker vse tri parametre U_{max} , D in ΔU upoštevamo enakovredno, je za rezultat odločilna visoka vrednost $\Delta U = 310$ V pri pulzu dolžine 20 μ s, ki je vsaj trikrat večja od vrednosti ΔU pri ostalih opazovanih kombinacijah električnih parametrov.

Vendar pa moramo pri enem pulzu dolžine 20 μ s celice tretirati z napetostjo 435 V! To je pri dvakrat večji napetosti, kot v primeru enega pulza dolžine 1000 μ s, kjer je vrednost kriterijske funkcije f nekoliko večja ($f = 0,026$) kot v minimumu.

	20 μs	100 μs	500 μs	1000 μs
1 pulz	0,020	0,061	0,033	0,026
4 pulzi	0,053	0,041	0,064	0,038
8 pulzov	0,091	0,047	0,060	0,039
16 pulzov	0,228	0,775	0,048	0,515
64 pulzov	0,074	0,049	POL	0,070

Tabela 3.1. Vrednosti kriterijske funkcije f pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi ter štiriinšestdesetimi pulzi dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Krepko je zapisana najmanjša vrednost. Oznaka POL označuje pol funkcije f .

Da bi zmanjšali vpliv te vrednosti, smo novo kriterijsko funkcijo g definirali tako, da v njej nastopa naravni logaritem elektroporacijskega intervala ΔU :

$$g = \frac{U_{\max}}{D \ln(\Delta U)} \quad (15)$$

V sledeči tabeli so zbrane vrednosti kriterijske funkcije g .

	20 μs	100 μs	500 μs	1000 μs
1 pulz	1,10	1,16	0,78	0,58
4 pulzi	1,24	0,86	0,81	0,56
8 pulzov	1,39	0,80	0,72	0,45
16 pulzov	1,91	2,98	0,54	1,72
64 pulzov	0,99	0,73	$\Delta U=0$	0,52

Tabela 3.2. Vrednosti kriterijske funkcije g pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi ter štiriinšestdesetimi pulzi dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Krepko je zapisana najmanjša vrednost.

Glede na kriterijsko funkcijo g je najboljši protokol, ki ga tvori vlak osmih pulzov dolžine 1000 μs . V tem primeru je celice potrebno tretirati z napetostjo 119 V, elektroporacijski interval je širok 43 V, uspešno pa se permeabilizira 70 % celic v opazovani populaciji.

Opisani kriterijski funkciji sicer dobro opisujeta zahteve za uspešno elektrokemoterapijo, toda eksperimentalno, v pogojih *in vivo*, bi težko kontrolirali vse tri parametre elektroporacije, ki kriterijski funkciji določajo. Zato zahteve nekoliko omilimo in definirajmo še tretjo kriterijsko funkcijo, ki bo zagotavljala čim nižji prag reverzibilne elektroporacije U_{p0} ter čim višji delež živih uspešno permeabiliziranih celic D :

$$k = \frac{U_{p0}}{D} \quad (16)$$

V sledeči tabeli so zbrane vrednosti kriterijske funkcije k .

	20 μs	100 μs	500 μs	1000 μs
1 pulz	5,11	4,29	3,04	2,05
4 pulzi	4,96	3,31	2,67	1,77
8 pulzov	5,26	2,88	2,35	1,47
16 pulzov	6,02	6,10	1,75	3,00
64 pulzov	3,47	2,53	3,63	1,24

Tabela 3.3. Vrednosti kriterijske funkcije k pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi ter štiriinšestdesetimi pulzi dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Krepko je zapisana najmanjša vrednost.

Glede na kriterijsko funkcijo k je najboljši tretma, ki ga tvori vlak štiriinšestdesetih pulzov dolžine 1000 μs . V tem primeru je celice potrebno tretirati z napetostjo 76 V, elektroporacijski interval je širok 23,5 V, uspešno pa se permeabilizira 46 % celic v opazovani populaciji.

3.6.2 Elektrotransfekcija

Nizka poracijska napetost je manj pomemben parameter. Najpomembnejši parameter je širina poracijskega intervala D .

Kriterijsko funkcijo zgradimo takole:

$$h = \frac{\ln(U_{\max})}{D \ln(\Delta U)} \quad (17)$$

V sledeči tabeli so zbrane vrednosti kriterijske funkcije h .

	20 μs	100 μs	500 μs	1000 μs
1 pulz	0,0153	0,0212	0,0175	0,0148
4 pulzi	0,0217	0,0185	0,022	0,0186
8 pulzov	0,0273	0,0207	0,027	0,0181
16 pulzov	0,0392	0,0838	0,0205	0,0764
64 pulzov	0,0223	0,0200	$\Delta U=0$	0,0298

Tabela 3.4. Vrednosti kriterijske funkcije h pri enem pulzu in vlakih s štirimi, osmimi, šestnajstimi ter štiriinšestdesetimi pulzi dolžine 20 μs , 100 μs , 500 μs in 1000 μs . Krepko je zapisana najmanjša vrednost.

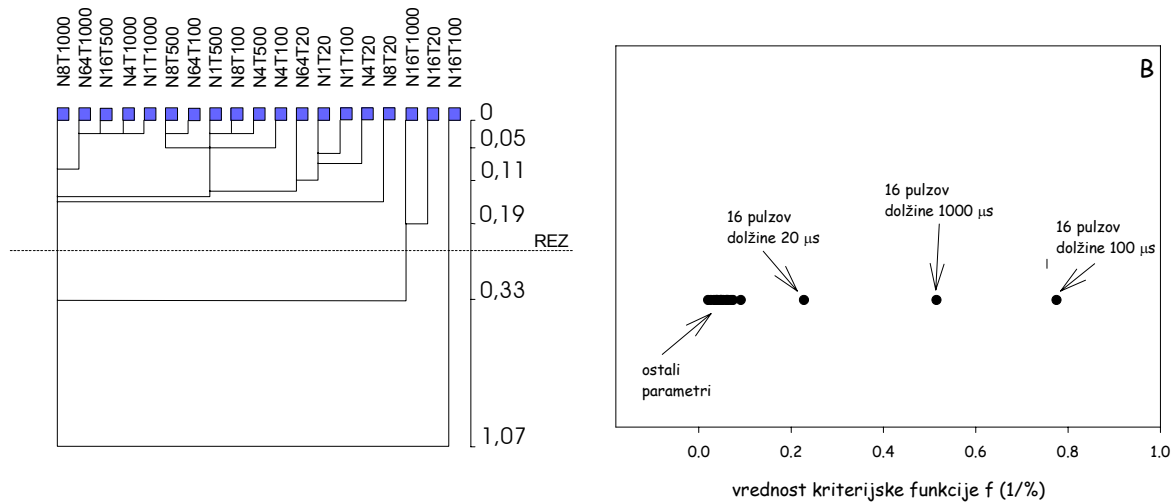
Glede na kriterijsko funkcijo h in opazovane električne parametre dosežemo najučinkovitejšo elektrotransfekcijo z enim pulzom dolžine 1000 μs . V tem primeru je celice potrebno tretirati z napetostjo 211 V, elektroporacijski interval je širok 104 V, uspešno pa se permeabilizira 78 % celic v opazovani populaciji.

3.6.3 Roji v vzorcih vrednosti kriterijskih funkcij

S kriterijskimi funkcijami med opazovanimi električnimi parametri res lahko določimo najučinkovitejše. Toda vse parametre, iz katerih smo izračunali vrednosti kriterijskih funkcij, smo razbrali iz krivulj, ki smo jih prilagodili eksperimentalnim podatkom. Trditev, da so parametri, pri katerih izbrana kriterijska funkcija doseže minimum, bistveno boljši od parametrov, pri katerih se vrednosti kriterijske funkcije od vrednosti v minimumu le malo razlikujejo, ni upravičena. Bolj upravičeno bi bilo na podlagi vrednosti kriterijske funkcije izločiti tiste električne parametre, ki so glede na izbrano aplikacijo bistveno manj učinkoviti od ostalih. S tem namenom smo rojili vrednosti posameznih kriterijskih funkcij. Kot mero razdalje med vzorci smo uporabili Evklidovo razdaljo. Rojenje smo izvedli s hierarhičnim postopkom [72] in ga ponazorili z dendrogramom. Roje vzorcev vrednosti kriterijskih funkcij smo določili z rezom najdaljših navpičnih črt v dendogramu; torej tam, kjer je razlika med podobnostjo, pri kateri se roji združijo v nov roj in podobnostjo, pri kateri so nastali, največja.

Kriterijska funkcija f

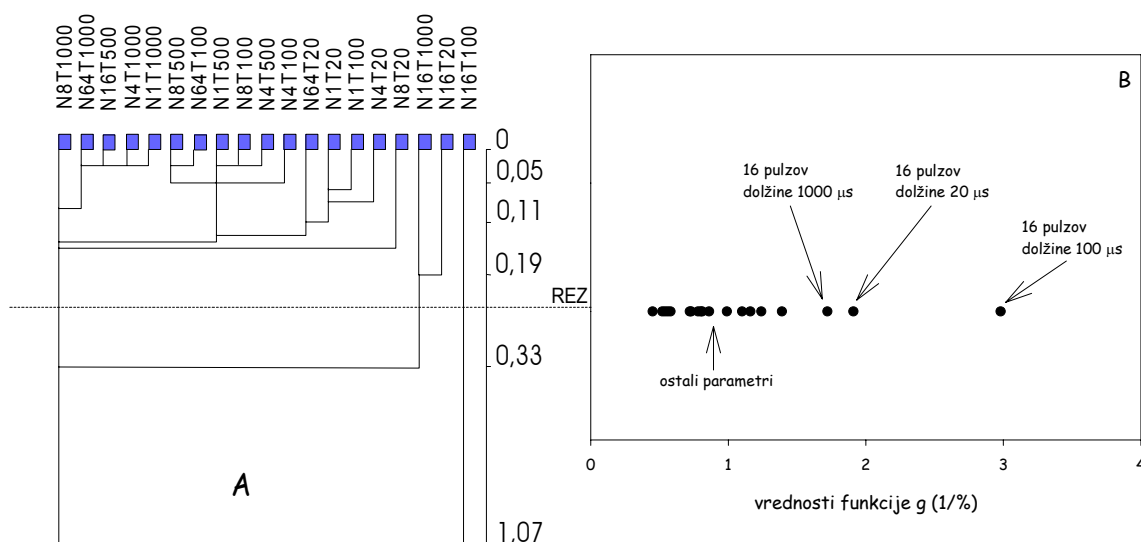
Iz dendograma rojenja vrednosti kriterijske funkcije f razberemo, da je vrednosti smiselno razdeliti v štiri roje (slika 3.13). Vrednosti kriterijske funkcije f pri vlakih 16 pulzov dolžin 20 μs , 1000 μs in 100 μs se bistveno razlikujejo med seboj in od vrednosti kriterijske funkcije f pri ostalih opazovanih parametrih.



Slika 3.13. Dendogram rojenja vrednosti kriterijske funkcije $f(A)$ in ustrezni roji (B). Vrednosti smo razdelili v štiri roje; prvega tvori vlak 16 pulzov dolžine 100 μs , drugega vlak 16 pulzov dolžine 1000 μs , tretjega vlak 16 pulzov dolžine 20 μs in četrtega vsi ostali opazovani parametri.

Kriterijska funkcija g

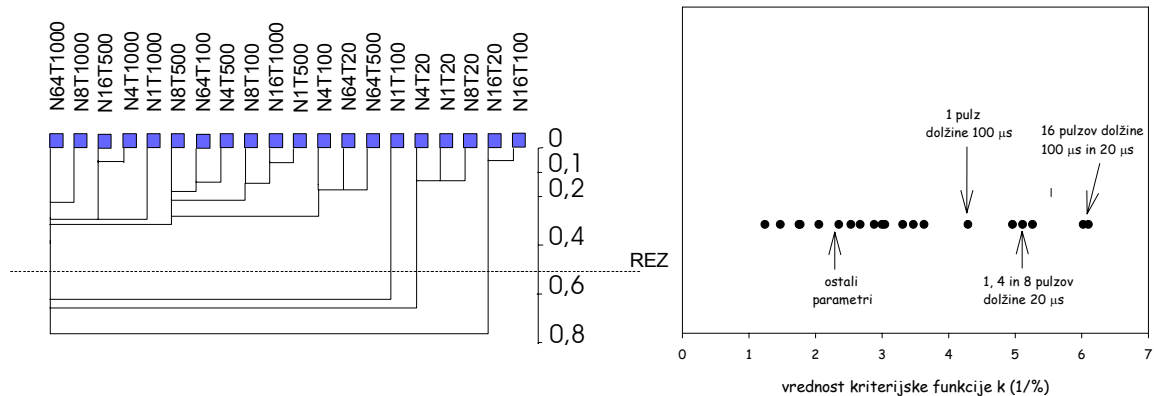
Iz dendograma rojenja vrednosti kriterijske funkcije g smo razbrali, da je vrednosti smiselno razdeliti v tri roje (slika 3.14). Vrednost kriterijske funkcije g pri vlak 16 pulzov, ki trajajo 100 μs , se bistveno razlikuje od vrednosti kriterijske funkcije f pri ostalih opazovanih parametrih, zato tvori samostojen roj. Vrednosti kriterijske funkcije g pri vlakih 16 pulzov dolžin 20 μs in 100 μs sta med seboj primerljivi, a različni od vrednosti kriterijske funkcije g pri ostalih opazovanih parametrih. Tvorita svoj roj. Tretji roj sestavljajo vrednosti kriterijske funkcije g pri vseh ostalih opazovanih parametrih.



Slika 3.14. Dendogram rojenja vrednosti kriterijske funkcije g (A) in ustrezni roji (B). Vrednosti smo razdelili v tri roje; prvega tvori vlak 16 pulzov dolžine 100 μs , drugega vlaka 16 pulzov dolžine 1000 μs in dolžine 20 μs in tretjega vsi ostali opazovani parametri.

Kriterijska funkcija k

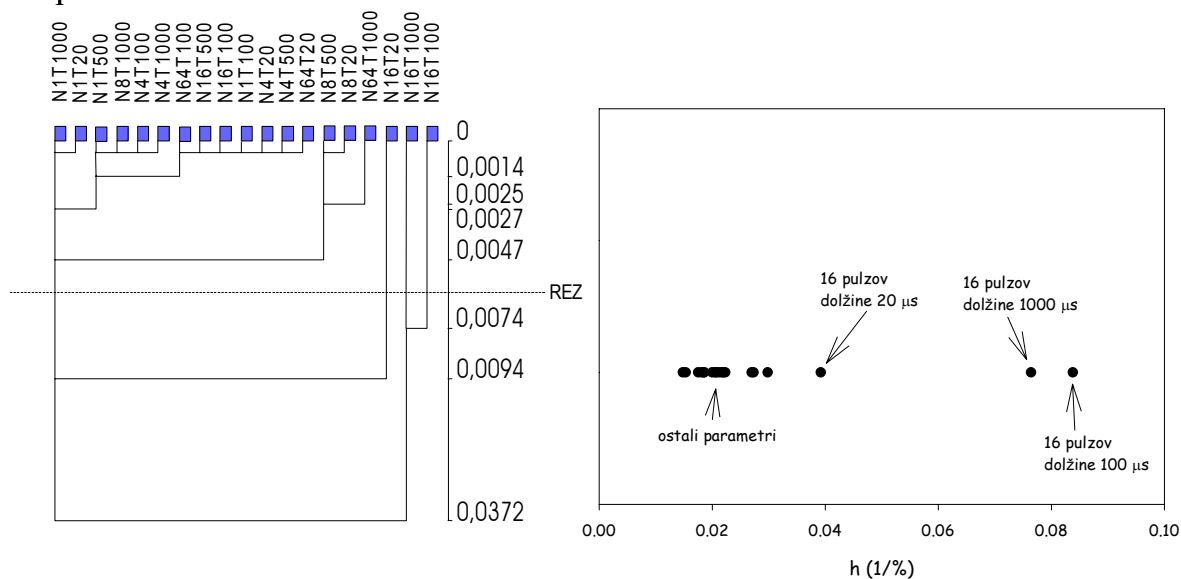
Vrednosti kriterijske funkcije k razdelimo v štiri roje (slika 3.15). Prvi roj tvorijo vrednosti kriterijske funkcije k pri vlakih 16 pulzov dolžin 100 μs in 20 μs , drugega vrednosti kriterijske funkcije k pri enem pulzu dolžine 100 μs in 20 μs ter tretjega vlaki štirih oziroma osmih pulzov dolžine 20 μs . Vrednosti kriterijske funkcije k pri naštetih protokolih se znatno razlikujejo od vrednosti kriterijske funkcije k pri ostalih opazovanih parametrih, ki tvorijo četrto roj.



Slika 3.15. Dendrogram rojenja vrednosti kriterijske funkcije k (A) in ustrezni roji (B). Vrednosti smo razdelili v štiri roje; prvega tvorita vlaka 16 pulzov dolžine $100\ \mu\text{s}$ in $20\ \mu\text{s}$, drugega vlaka 8 in 4 pulzov dolžine $20\ \mu\text{s}$ ter en pulz dolžine $100\ \mu\text{s}$ in četrtega vsi ostali opazovani parametri.

Kriterijska funkcija h

Vrednosti kriterijske funkcije h je smiselno razdeliti v štiri roje (slika 3.16). Vrednosti kriterijske funkcije h pri vlakih 16 pulzov dolžin $100\ \mu\text{s}$, $1000\ \mu\text{s}$ in $20\ \mu\text{s}$ se bistveno razlikujejo med seboj in od vrednosti kriterijske funkcije h pri ostalih opazovanih parametrih.



Slika 3.16. Dendrogram rojenja vrednosti kriterijske funkcije h (A) in ustrezni roji (B). Vrednosti smo razdelili v štiri roje; prvega tvorita vlak 16 pulzov dolžine $100\ \mu\text{s}$, drugega vlak 16 pulzov dolžine $1000\ \mu\text{s}$, tretjega vlak 16 pulzov dolžine $20\ \mu\text{s}$ in četrtega vsi ostali opazovani parametri.

3.7 Frekvenca ponavljanja pulzov

Pragova reverzibilne in ireverzibilne poracije, širino elektroporacijskega intervala, največji delež živih uspešno permeabiliziranih celic in vrednosti kriterijskih funkcij f in g smo določili tudi pri vlakcu osmih pulzov dolžine 100 μ s, kjer so si električni pulzi sledili s frekvenco 10 Hz. Vrednosti so zbrane v spodnji tabeli. Zaradi lažje primerjave smo dodali v tabelo tudi vrednosti parametrov pri "standardu elektrokemoterapije" osmih pulzih dolžine 100 μ s, ki si sledijo s frekvenco 1 Hz.

parameter	Vrednost pri frekvenci 1 Hz	Vrednost pri frekvenci 10 Hz
prag reverzibilne elektroporacije	173 V	172 V
prag ireverzibilne elektroporacije	246 V	280 V
širina elektroporacijskega intervala	73 V	108 V
napetost pri največjem deležu živih uspešno permeabiliziranih celic	205 V	233,5 V
največji delež živih uspešno permeabiliziranih celic	60 %	78 %
kriterijska funkcija f	0,047 1/%	0,028 1/%
kriterijska funkcija g	0,80 1/%	0,64 1/%
Kriterijska funkcija k	2,88 V/%	2,20 V/%
kriterijska funkcija h	0,0207 1/%	0,0149 1/%

Tabela 3.5. Vrednosti parametrov s katerimi smo vrednotili uspešnost elektroporacije v pogojih *in vitro* za vlak osmih pulzov dolžine 100 μ s, kjer so si električni pulzi sledili s frekvenco 10 Hz in vlak osmih pulzov dolžine 100 μ s, kjer si električni pulzi sledijo s frekvenco 1 Hz.

Praga reverzibilne elektroporacije sta v obeh primerih enaka, prag ireverzibilne elektroporacije pa je v primeru ponavljalne frekvence 10 Hz nekoliko višji. Zato je širši tudi elektroporacijski interval; napetost, pri kateri dosežemo največji delež uspešno permeabiliziranih celic pa višja. Po vrednostih kriterijskih funkcij f , g , k in h sodeč, je višja frekvenca aplikacije električnih pulzov resda ugodnejša, toda ker smo opravili primerjavo le pri enem številu pulzov z izbranim trajanjem, ugotovitve ne smemo posplošiti.

3.8. Vpliv časovnega razmika med pravokotnimi pulzi na porušitveno napetost lipidnega dvosloja

Preučevali smo vpliv časovnega zamika (pavze) med šestnajstimi pravokotnimi pulzi dolžine 100 μs na porušitveno napetost lipidnega dvosloja. Pavzo med pulzi smo s faktorjem 10 povečevali od 1 μs do 1000 μs . Pulz dolžine 1600 μs nam je predstavljal vlak šestnajstih pulzov z medsebojnim časovnim zamikom 0 μs . Pulz dolžine 100 μs pa vlak šestnajstih pulzov, v katerem je pavza med pulzi neskončno dolga (slika 2.9 v poglavju Materiali in metode).

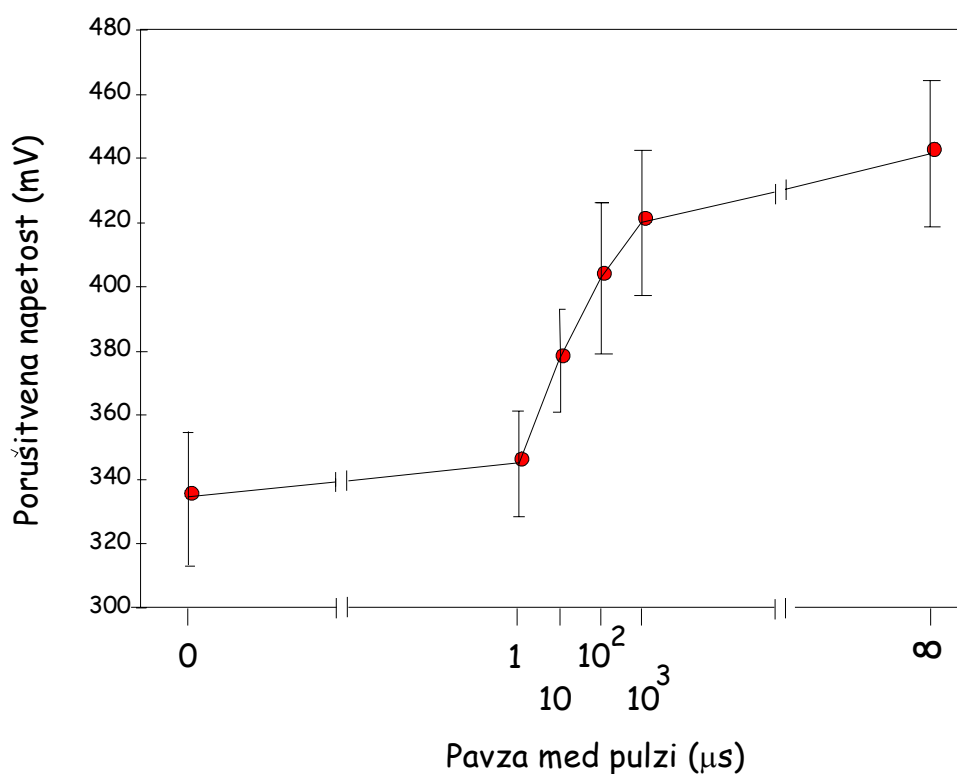
V tabeli 3.6 so podane povprečne porušitvene napetosti s standardnimi deviacijami in povprečne specifične kapacitivnosti lipidnih dvoslojev za vsako opazovano pavzo med pulzi.

Pavza med pulzi v vlakcu (μs)	Porušitvena napetost (mV)	Specifična kapacitivnost lipidnega dvosloja ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)
0	334 ± 21	$0,54 \pm 0,10$
1	345 ± 16	$0,55 \pm 0,12$
10	377 ± 16	$0,52 \pm 0,10$
100	402 ± 24	$0,52 \pm 0,10$
1000	420 ± 23	$0,50 \pm 0,05$
inf	441 ± 23	$0,60 \pm 0,11$

Tabela 3.6. Povprečne porušitvene napetosti lipidnih dvoslojev in njihove specifične kapacitivnosti pri različnih časovnih zamikih med pulzi z ustreznimi standardnimi deviacijami.

Specifične kapacitivnosti lipidnih dvoslojev v vseh šestih skupinah so približno enake. Povprečna kapacitivnost vseh lipidnih dvoslojev je $0,54 + 0,09 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Rezultati porušitvenih napetosti so bolj pregledni na sliki, ki prikazuje odvisnost porušitvene napetosti lipidnega dvosloja od pavze med pulzi (slika 3.17). Med povprečno porušitveno napetostjo lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni enemu 1600 μs trajajočemu pulzu (334 mV) in povprečno porušitveno napetostjo lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni vlakcu šestnajstih pulzov med katerimi je bila pavza dolga le 1 μs (345 mV) ni bistvene razlike ($p > 0,1$). Povprečna vrednost porušitvene napetosti lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni vlakcu šestnajstih pulzov s pavzo 10 μs (377 mV), pa je značilno različna od obeh prej omenjenih ($p < 0,05$). Povprečna vrednost porušitvene napetosti lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni vlakom šestnajstih pulzov s pavzami 10 μs , 100 μs in 1000 μs se z desetiškim logaritmom časa povečuje praktično linearno. Med porušitveno napetostjo lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni šestnajstim pulzom s pavzo 1000 μs (420 mV) in porušitveno napetostjo lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni le enemu pulzu dolžine 100 μs (441 mV) pa je razlika spet manjša ($p > 0,1$).

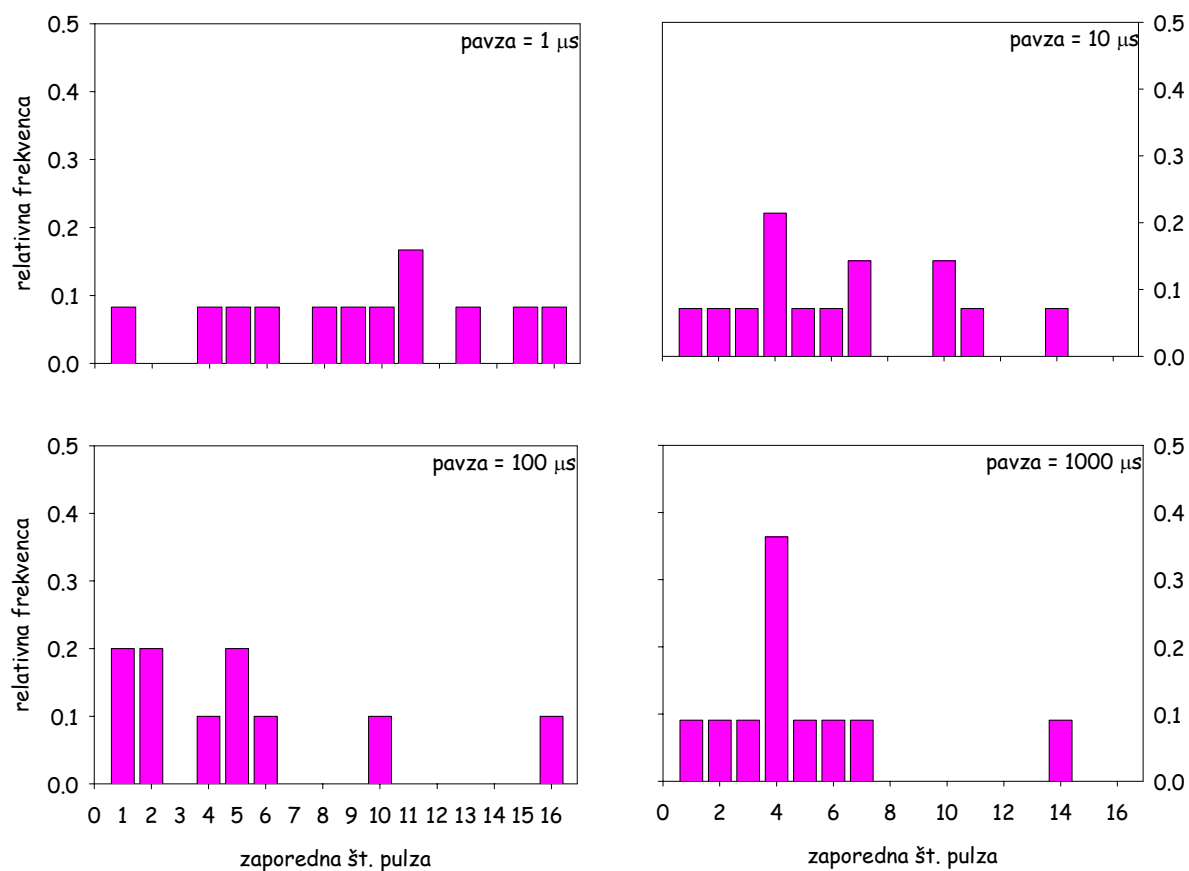
Iz rezultatov lahko sklepamomo, da z vlakom pulzov z ustrezno frekvenco lahko znižamo porušitveno napetost lipidnega dvosloja. V našem primeru (16 pulzov dolžine 100 μs) s frekvenco približno 10 kHz znižamo porušitveno napetost na napetost, ki jo sicer za porušitev lipidnega dvosloja potrebuje en pulz dolžine 1600 μs .



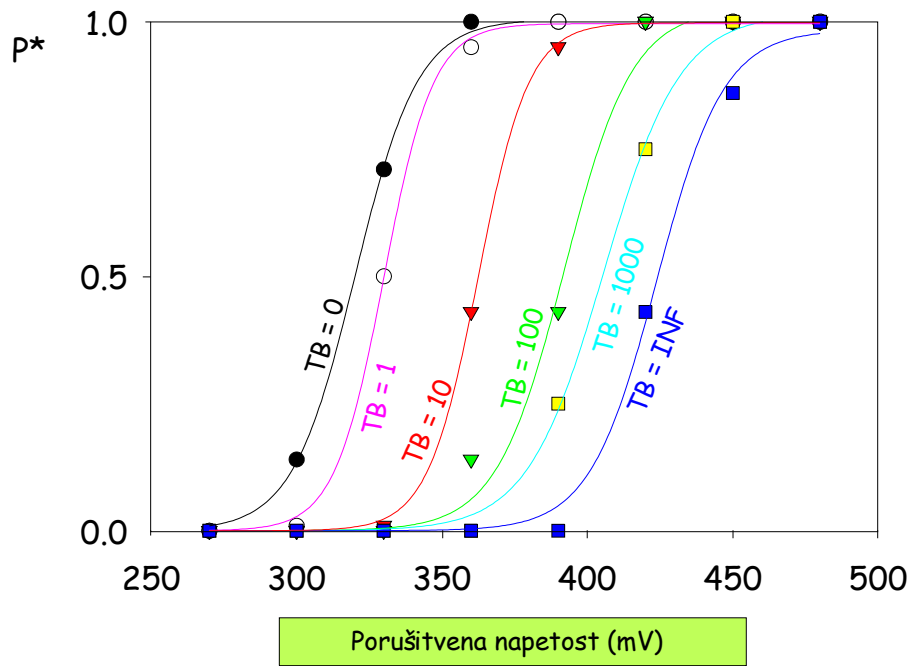
Slika 3.17. Porušitvena napetost lipidnega dvosloja v odvisnosti od pavze med pulzi. Podane so povprečne vrednosti in njihove standardne deviacije. V vsaki točki smo naredili vsaj šest meritev.

Zapisali smo tudi zaporedno številko pulza, v katerem se je lipidni dvosloj porušil (slika 3.18). Kadar je pavza med pulzi enaka 1 μs , je relativna frekvenca porušitve enakomerno porazdeljena med pulzi. Z daljšanjem pavze med pulzi v vlakcu pa postane relativna frekvenca porušitve večja v prvi polovici vlaka. Kadar je pavza med pulzi enaka 1000 μs , se velika večina lipidnih dvoslojev poruši v prvi polovici vlaka.

Na sliki 3. 19 so prikazane verjetnosti porušitve lipidnega dvosloja (P^*) v odvisnosti od napetosti pri različnih pavzah med pulzi.



Slika 3.18. Relativna frekvenca porušitve lipidnega dvosloja pri posameznih pulzih v vlakcu šestnajstih pulzov. Kadar pavza med pulzi traja 1 μs , je relativna frekvenca porušitve enakomerno porazdeljena med pulzi v vlakcu. Kadar pa je pavza med pulzi 1000 μs , se večina lipidnih dvoslojev poruši v prvi polovici vlakca.



Slika 3.19. Verjetnosti porušitve lipidnega dvosloja (P^*) v odvisnosti od napetosti pri različnih pavzah med pulzi.

4. RAZPRAVA

Elektroporacija je v zadnjih letih postala ena izmed standardnih laboratorijskih metod. Tudi njena uporaba v kliničnem okolju je v porastu. Toda električni parametri, ki so za določeno aplikacijo najprimernejši, še vedno niso natančno določeni. Temu botruje nepoznavanje natančnega mehanizma elektroporacije, ki iskanje optimalnih električnih parametrov za izbrano aplikacijo več ali manj omejuje na eksperimentalne študije. Največkrat se optimizacija zoži na spreminjanje enega od električnih parametrov, večinoma napetosti, medtem ko ostali ostanejo konstantni [5]. Sistematičnih študij, ki bi med seboj povezovala več električnih parametrov pa je bore malo. Zasledimo študije vpliva trajanja električnega pulza pri izbranem številu električnih pulzov, frekvenci in napetosti ter vpliva števila električnih pulzov pri izbranem trajanju, frekvenci in napetosti na učinkovitost elektropermeabilizacije in transfekcije [69, 81, 120]. Veliko manj pa je takih, v katerih je med seboj povezanih večje število električnih parametrov [79, 82]. Ena od takih povezav je električna energija, ki jo med poskusom dovedemo celicam.

Kubiniec s sodelavci [44], Neumann [60] in Neumann s sodelavci [63] so opazovali vpliv dolžine električnega pulza (bodisi eksponentno padajočega bodisi pravokotnega) in napetosti na učinkovitost elektroporacije v *in vitro* pogojih. Ugotovili so, da je učinkovitost permeabilizacije [60] in transfekcije [44, 63] sorazmerna energiji električnega pulza. Tudi Okino s sodelavci je s poskusi *in vivo* na podganah pokazal, da je uspešnost elektrokemoterapije proporcionalna električni energiji [67]. Uspešna elektrokemoterapija je bila dosežena z zelo raznolikimi električnimi parametri [47], kar ponuja energijo tretmaja kot odločujočo spremenljivko [38].

Ker so bili vsi omenjeni poskusi v pogojih *in vitro* izvedeni zgolj z enim električnim pulzom, nas je zanimalo, kakšen je vpliv električne energije, ki jo z vlakom električnih pulzov dovedemo celični suspenziji, na preživetje celic in permeabilizacijo celic. Naša študija je pokazala, da je v okviru protokolov z enako med poskusom dovedeno električno energijo, a različnimi preostalimi električnimi parametri (število pulzov, trajanje pulza, frekvenca), delež živih uspešno permeabiliziranih celic različen. Dokler celice izpostavljamo napetostim, ki še ne povzročijo ireverzibilne elektroporacije, je uspešnost elektroporacije med protokoli z enako električno energijo določena s trajanjem pulzov v vlakom (slika 3.2).

Rezultate naše študije sta potrdila Rols in Teissie [82]. Primerjala sta protokole v katerih so bile celice električnim pulzom izpostavljene 50 ms na področju od desetih 5 ms trajajočih pulzov, ki so si sledili s frekvenco 1 Hz, pa do pet tisoč 10 μ s trajajočih pulzov, ki so si sledili s frekvenco 500 Hz. Uporabila sta enako testno molekulo – propidijev jodid in uspešnost elektropermeabilizacije ravno tako spremljala s pretočno citometrijo. Tudi njun zaključek je, da je ključni parameter uspešne elektropermeabilizacije, pri tako izbranih protokolih, trajanje pulza v vlakom in ne dovedena energija.

V literaturi nismo zasledili sistematične definicije parametrov, ki bi opisovali elektroporacijo v pogojih *in vitro*. Uspešnost elektropermeabilizacije je običajno podana z deležem permeabiliziranih celic v opazovanem vzorcu [81, 82, 120], uspešnost elektrotransformacije pa kot število transformiranih celic glede na gram uporabljene DNA [122] ali kot število transformiranih celic v 1 ml [63]; seveda, ob

kontroli celičnega preživetja. Toda, da bi določili optimalne električne parametre za izbrano aplikacijo elektroporacije, to ni dovolj [60]. Zato smo na osnovi obsežne študije celičnega preživetja in elektropermeabilizacije celic s propidijevim jodidom definirali pet parametrov, ki so namenjeni vrednotenju elektroporacije v pogojih *in vitro*.

Za prag reverzibilne elektroporacije smo postavili zahtevo, da je permeabiliziranih vsaj 50 % celic v opazovanem vzorcu. Podobno definicijo je postavil Neumann [60]. Električno poljsko jakost, pri kateri je permeabiliziranih 50% celic, je imenoval povprečna vrednost električne poljske jakosti za permeabilizacijo izbranih celic z izbrano testno molekulo. Ugotovili smo, da pragovna napetost reverzibilne elektroporacije pri izbranem trajanju pulzov v vlakcu upada s številom pulzov do vlakca, ki vsebuje osem pulzov. Z daljšimi vlakci pa ne dosežemo več znatnega znižanja. V literaturi so odvisnost elektroporacije od števila pulzov v vlakcu večinoma spremljali z uspešnostjo permeabilizacije pri izbrani dolžini pulza in napetosti. Uspešnost elektropermeabilizacije se pri izbrani napetosti in dolžini pulza povečuje s številom pulzov [81, 120]. Povečevanje je znatno do vlakcov z desetimi pulzi, kar se ujema z našimi rezultati (glej Dodatek). S študijo smo pokazali, da prag reverzibilne elektroporacije pri izbranem številu pulzov v vlakcu upada s trajanjem pulzov v vlakcu. Krivulja, ki opisuje pragovno napetost reverzibilne elektroporacije v odvisnosti od trajanja pulza, je pravzaprav nekakšna intenzivnostno časovna krivulja izbranih celic za izbrano testno molekulo. Podobno, kot je za sprožitev akcijskega potenciala pri vzdražnih celicah potrebno membrano depolarizirati do pragovne vrednosti, je potrebno tudi za nastanek pojave elektroporacije, spremeniti napetost na celični membrani do pragovne vrednosti. Odlično ujemanje izmerjenih točk z vsoto dveh eksponentno padajočih krivulj nakazuje opis pojave z dvokomponentnim modelom. Razlago za tako obliko krivulje lahko poiščemo v različnih časovnih potekih elektroporacije na obeh celičnih polih [37, 108]. Vzroki asimetrične elektroporacije zaenkrat niso povsem pojasnjeni. Večinoma prevladuje mnenje, da je vzrok v asimetriji transmembranske napetosti na polih celice, ki je v električnem polju in v strukturi celične membrane. Na polih celice so namreč nabite komponente v membrani izpostavljene nasprotujočim si smerem električnega polja, zato so tudi smeri in velikosti sil, ki delujejo na te komponente različne [37, 109]. Posledica sta lahko tudi različni prevodnosti in kapacitivnosti celične membrane na obeh polih, kar pomeni različni časovni konstanti dvokomponentnega modela.

Prag ireverzibilne elektroporacije smo definirali kot napetost, pri kateri ostane živih le še 50% celic v opazovanem vzorcu. Pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije pri izbranem trajanju pulza upada s številom pulzov v vlakcu. Upadanje do števila šestnajst je znatno; pri večjem številu pulzov pa se prag ireverzibilne elektroporacije praktično ne spremeni več. V literaturi so tudi študije preživetja celic v odvisnosti od električnih parametrov relativno skromne [5, 82]. Preživetje celic pri izbranem trajanju pulzov in izbrani napetosti upada s številom pulzov v vlakcu [82, 122], kar je skladno z našimi rezultati (Dodatek). Preživetje celic pri izbranem številu pulzov in izbrani napetosti upada s trajanjem pulza; tudi v tem primeru se rezultati naših eksperimentov ujemajo z rezultati, ki so objavljeni v literaturi [82, 122]. Tudi pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije pri izbranem številu pulzov v vlakcu upada v odvisnosti od trajanja posameznega pulza v vlakcu. Podobne definicije v literaturi nismo zasledili.

Širina elektroporacijskega intervala določa napetostno območje v katerem je elektroporacija celic še zadovoljiva; bodisi s stališča elektropermeabilizacije celice, bodisi s stališča celičnega preživetja. S študijo smo pokazali, da trajanje pulza v vlakcu z izbranim številom pulzov nima znatnega vpliva na širino elektroporacijskega intervala; je pa širina elektroporacijskega intervala odvisna od števila pulzov v vlakcu pri izbranem trajanju pulza. Najmanjša je pri vlakih šestnajstih pulzov, saj se prav do tega števila znižuje pragovna napetost ireverzibilne elektroporacije, pragovna napetost reverzibilne elektroporacije pa se je praktično nehala zniževati že pri vlakih z osmimi pulzi. Neumann [60] je definiral podoben parameter. Določil je krivulji, ki opisujeta delež med električnim pulzom permeabiliziranih celic in delež celic, ki si po dolgem času ne opomore, v odvisnosti od jakosti električnega polja. Področje, kjer je razlika med krivuljama večja od nič, je označil kot optimalno področje električne poljske jakosti.

Preostala dva parametra, ki smo ju definirali sta delež živih, uspešno permeabiliziranih celic in napetost, pri kateri tak delež dosežemo. Po naših rezultatih sodeč je delež živih, uspešno permeabiliziranih celic najmanj natančno določen parameter, ker je zelo odvisen od napenjanja sigmoidne krivulje na izmerjene točke. Ti pa sta prav v okolici obeh "kolen" obremenjeni z največjimi napakami (glej Dodatek).

Kriterijske funkcije smo definirali z namenom, da bi za željeno aplikacijo elektroporacije določili električne parametre, ki naj bi dali optimalen rezultat. Ker smo vse parametre elektroporacije (razen pragu ireverzibilne elektroporacije) definirali na podlagi permeabilizacije celic DC3F s propidijevim jodidom v poracijskem mediju z izbrano prevodnostjo, imajo vrednosti teh parametrov zelo omejeno vlogo. Če smo natančni; vrednosti veljajo le za celice DC3F v enakem poracijskem mediju in propidijev jodid kot testno molekulo. Vrednosti približno veljajo za testne molekule s podobno molekulsko maso, zgradbo in nabojem. Gotovo pa se vrednosti parametrov elektroporacije bistveno razlikujejo, če kot testno molekulo uporabimo DNK, ki se od propidijevega jodida ne razlikuje le po molekulski masi in strukturi, temveč tudi po mehanizmu s katerim prehaja skozi celično membrano. S tega stališča smo kriterijske funkcije predstavili predvsem kot enega od možnih pristopov k problemu optimizacije električnih parametrov pri elektroporaciji. Podoben pristop v literaturi še ni bil predstavljen.

Na osnovi rezultatov dobljenih s kriterijskimi funkcijami lahko zaključimo, da je smiselna elektroporacija z vlakci, ki so krajši ali enaki 8 pulzov. Trajanje pulzov v vlakcu pa naj bo čim daljše (1 ms).

Študija, ki smo jo naredili z uporabo osmih pulzov dolžine 100 μ s ter frekvencah 1 Hz in 10 Hz nakazuje, da višja frekvenca pulzov v vlakcu izboljša uspešnost elektroporacije. Vendar pa na osnovi primerjave dveh frekvenc pri enem naboru prostalih električnih parametrov ne moremo trditi, da je višja frekvenca električnih pulzov ugodnejša. Zaradi neskladja med sliko in tekstom v članku Wolfa s sodelavci [120] ne moremo sklepati kakšni so zaključki njihove študije uspešnosti elektrotransfekcije pri izbranem številu električnih pulzov, trajanju pulza in izbrani napetosti v odvisnosti od frekvence pulzov.

Generator visokonapetostnih električnih pulzov, ki smo ga uporabljali pri poskusih na celicah v pogojih *in vitro*, lahko generira le zaporedne pulze v frekvenčnem območju do 10 Hz. Odločili smo se, da vpliv frekvence pulzov na poracijsko napetost analiziramo na modelu celične membrane – planarnem lipidnem dvosloju. Študirali smo vpliv frekvence šestnajstih pulzov dolžine 100 μs na porušitveno napetost lipidnega dvosloja. Šestnajst pulzov v vlakcu smo izbrali zato, ker se porušitveni napetosti enega pulza dolžine 100 μs (frekvenca pulzov je 0) in enega pulza dolžine 1600 μs (frekvenca pulzov je neskončno velika) znatno razlikujeta. Pričakovali smo, da bomo z zadovoljivo natančnostjo lahko izmerili tudi porušitvene napetosti lipidnega dvosloja vlakcov z vmesnimi frekvencami.

Rezultati študije so pokazali, da s frekvenco električnih pulzov 10kHz v vlakcu šestnajstih pulzov dolžine 100 μs lahko znižamo porušitveno napetost lipidnega dvosloja na porušitveno napetost, ki jo ima sicer en pulz dolžine 1600 μs .

5. SKLEP

- S študijo protokolov z enako med poskusom dovedeno električno energijo, a različnimi preostalimi električnimi parametri, smo dokazali, da v področju napetost, ki še ne vplivajo na preživetje celic, deleža živih uspešno permeabiliziranih celic ne določa dovedena električna energija. Elektropermeabilizacija je uspešnejša, kadar uporabimo daljše pulze.
- Določili smo parametre, s katerimi lahko vrednotimo elektroporacijo v pogojih *in vitro*.
- Določili smo kako so parametri elektroporacije odvisni od števila pulzov v vlaku in od trajanja pulzov v vlaku pri frekvenci 1 Hz.
- Z definicijami kriterijskih funkcij smo nakazali nov pristop k optimizaciji električnih parametrov elektroporacije za izbrano aplikacijo.
- S študijo vpliva frekvence pulzov v vlaku na porušitveno napetost planarnega lipidnega dvosloja smo poiskali frekvenco, s katero lahko učinkovito znižamo njegovo porušitveno napetost.

6. LITERATURA

- [1] Abidor IG, Arakelyan VB, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Tarasevich MR. Electric breakdown of bilayer lipid membranes I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 37 – 52.
- [2] Arakelyan VB, Chizmadzhev YA, Pastushenko VF. Electric breakdown of bilayer lipid membranes V. Consideration of the kinetic stage in the case of the membrane containing an arbitrary number of defects. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 81 – 87.
- [3] Bartoletti DC, Harrison GI, Weaver JC. The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *FEBS Lett* 1989; 256: 4 - 10
- [4] Belehradek M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradek J Jr, Mir LM. Electrochemotherapy, a New Antitumor Treatment. *Cancer* 1993; 72: 3694 - 700.
- [5] Baum C, Forster P, Hegewisch Becker S, Harbers K. An optimized electroporation protocol applicable to wide range of cell lines. *BioTechniques* 1994; 17, 1058 – 1062.
- [6] Benga G. Structure and properties of cell membranes. Vol. 1. CRC Press 1985.
- [7] Benz R, Beckers F, Zimmermann U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge – pulse relaxation study. *J Membrane Biol.* 1979; 48, 181- 204.
- [8] Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970; 30: 1174-1184.
- [9] Bobanović F. *Vpliv električnih polj na fiziološke parametre aktivacije živčnih celic*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, 1996: 66 - 97.
- [10] Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, London 1994.
- [11] Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. New York: Academic Press, 1992: 1 - 411.
- [12] Chernomordik LV, Sukharev SI, Popov SV, Pastushenko VF, Sokirko AV, Abidor IG, Chizmadzhev YA. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim Biophys Acta* 1987; 902, 360-373
- [13] Chernomordik LV, Sukharev SI, Chernomordik LV, Sukharev SI, Chizmadzhev YA. Breakdown of lipid bilayer membranes in an electric field. *Biochim Biophys Acta* 1983; 736, 203-213.

- [14] Chizmadzhev YA, Arakelyan VB, Pastushenko VF. Electric breakdown of bilayer lipid membranes III. Analysis of possible mechanisms of defect origination. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 63 – 70.
- [15] Chizmadzhev YA, Pastushenko VF. Electrical breakdown of bilayer lipid membranes. V: Thin Liquid Films, poglavje 15, Marcel Dekker, New York 1988, 1059 – 1120.
- [16] Colquhoun D. Lectures on biostatistics. Oxford University press 1971; 137-148.
- [17] Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Analytical Biochemistry* 1989; 179: 1-7.
- [18] Crowley JM. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophysical Journal* 1973; 13, 711-724.
- [19] Čemažar M. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, 1996.
- [20] Čemažar M, Milačič R, Miklavčič D, Dolžan V, Serša G. Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content. *Anti-Cancer Drugs* 1998; 9: 525 – 530.
- [21] Čemažar M, Miklavčič D, Vodovnik L, et al. Improved therapeutic effect of electrochemotherapy with cisplatin by intratumoral drug administration and changing of electrode orientation for electroporation on EAT tumor model in mice. *Radiol Oncol* 1995; 29: 121 - 7.
- [22] Devore JL. Probability and statistics for engineering and the sciences. Duxbury Press, New York, 1995.
- [23] Diederich A, Bähr G, Winterhalter M. Influence of surface charges on the rupture of black lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1998;
- [24] Dimitrov DS, Sowers AE. Membrane electroporation - fast molecular exchange by electroosmosis. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1022: 381 - 92.
- [25] Domenge C, Orlowski S, Luboinski B, et al. Antitumor Electrochemotherapy New Advances in the Clinical Protocol. *Cancer* 1996; 77: 956 - 63.
- [26] Ehrlich BE. Incorporation of ion channels in planar lipid bilayers: how to make bilayers work for you. V: Fozzard et al., uredniki: The heart and cardiovascular system, Raven Press Ltd, New York 1992; 551 – 560.
- [27] Escande-Geraud ML, Rols MP, Dupont MA, Gas N, Teissie J. Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporation in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 939: 247 - 59.

- [28] Glaser RW, Leikin SL, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko AI. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim Biophys Acta* 1988; 940: 275 - 287.
- [29] Glass LF, Jaroszeski MJ, Gilbert RA, Reintgen DS, Heller R. Intralesional bleomycin – mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1997; 37: 596 – 599.
- [30] Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1998; 9: 319 – 325.
- [31] Gift EA, Weaver JC. Observation of extremely heterogeneous electroporative molecular uptake by *Saccharomyces cerevisiae* which changes with electric field pulse amplitude. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1234: 52 - 62.
- [32] Golzio M, Mora MP, Raynaud C, Delteil C, Teissie J, Rols MP. Control by osmotic pressure of voltage – induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1998; 74: 3015 – 3022.
- [33] Hamilton WA, Sale AJH. Effects of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 789 - 800.
- [34] Harrison RL, Byrne BJ, Tung L. Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Letters* 1998; 435: 1 – 5.
- [35] Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, et al. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 1996; 77: 964 - 71.
- [36] Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, Puleo CA, DeConti RC, Gilbert RA, Glass LF. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* 1998; 83: 148 – 157.
- [37] Hibino M, Itoh H, Kinoshita K Jr. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J* 1993; 64: 1789 – 1800.
- [38] Jaroszeski M, Gilbert R, Heller R. In vivo antitumor effects of electrochemotherapy in a hepatoma model. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1334: 15-18.
- [39] Kinoshita KJ, Tsong TY. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 1977; 268: 438 - 41.

- [40] Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J* 1991; 60: 804 - 11.
- [41] Klotz KH, Winterhalter M, Benz R. Use of irreversible electrical breakdown of lipid bilayers for the study of interaction of membranes with surface active molecules. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1147, 161-164.
- [42] Kornhauser A, Perpar M. *Organska kemija*. Državna založa Slovenije, Ljubljana 1977.
- [43] Kotnik T, Bobanović F, Miklavčič D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields - a theoretical analysis. *Bioelectrochem Bioenerg* 1997; 43: 285 -91.
- [44] Kubiniec RT, Liang H, Hui SW. Effects of pulse length and pulse strength on transfection by electroporation. *Biotechniques* 1990; 8: 16-21.
- [45] Kuščer I. *Matematične naloge iz fizike*. Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za fiziko, 1979: 321-328.
- [46] Lynch PT, Davey MR. *Electrical manipulation of cells*. New York: Chapman & Hall, 1996: 185 - 200.
- [47] Maček Lebar A, Kopitar NA, Ihan A, Serša G, Miklavčič D. Significance of treatment energy in cell electroporation. *Electro- and Magnetobiology* 1998; 17: 255-262.
- [48] Lindermann M, Steinmetz M, Winterhalter M. Rupture of lipid membranes. *Progr Colloid Polym Sci* 1997; 105: 209-213.
- [49] Miklavčič D, Beravs K, Šemrov D, Čemažar M, Demšar F, Serša G. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys J* 1998; 74: 2152 – 2158.
- [50] Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 1988; 175: 15 - 25.
- [51] Mir LM, Orlowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; 27: 68 -72.
- [52] Mir LM, Orlowski S, Poddevin B, Belehradek J Jr. Electrochemotherapy tumor treatment is improved by interleukin-2 stimulation of the host's defenses. *Eur. Cytokine Netw.* 1992; 3: 331 - 4.
- [53] Mir LM, Roth C, Orlowski S, et al. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J Immunother* 1995; 17: 30 - 8.

- [54] Mir LM, Belehradec M, Domenge C, et al. L'electrochimiotherapie, un nouveau traitement antitumoral: premier essai clinique. *C R Acad Sci Paris 1991; 313*: 613 - 8.
- [55] Mir LM, Glass LF, Serša G, et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *B J Cancer 1998; 77*: 2336 – 2342.
- [56] Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, Scherman D. Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie 1998; 321*: 893 – 899.
- [57] Montal M, Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc Nat Acad Sci USA 1972; 69*: 3561 – 3566.
- [58] Mouneimne Y, Tosi PF, Gazitt Y, Nicolau C. Electro-insertion of xeno-glycophorin into the red blood cell membrane. *Biochem Bioph Res Co 1989; 159*: 34 - 40.
- [59] Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, New York: Plenum Press, 1989: 1 - 105. Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, New York: Plenum Press, 1989: 1 - 105.
- [60] Neumann E. Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochem Bioenerg 1992; 28*: 247 - 67.
- [61] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J 1982; 1*: 841 - 5.
- [62] Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membrane Biol 1972; 10*: 279 - 90.
- [63] Neumann E, Kakorin S, Tsoneva B, Nikolova B, Tomov T. Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation. *Biophys J 1996; 71*: 868 - 877.
- [64] Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S et al. High-efficiency *in vivo* gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following *in vivo* electroporation. *Cancer Res 1996; 56*: 1050 - 5.
- [65] Okino M, Mohri H. Effects of high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res 1987; 78*: 1319 - 21.

- [66] Okino M, Esato K. The effects of a single high voltage electrical stimulation with an anticancer drug on in vivo growing malignant tumors. *Jpn J Surg* 1990; 20: 197 - 204.
- [67] Okino M, Tomie H, Kanesada H, Marumoto M, Estao K, Suzuki H. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1095-1101.
- [68] Orłowski S, Mir L. Cell electroporability: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 51 - 63.
- [69] Orłowski S, Belehradec J Jr, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporability of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4727 - 33.
- [70] Orłowski S, An D, Belehradec J Jr, Mir LM. Antimetastatic effects of electrochemotherapy and of histoincompatible interleukin-2-secreting cells in the murine Lewis lung tumor. *Anti-Cancer Drugs* 1998; 9: 551 - 556.
- [71] Ozil JP, Swann K. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J Phys* 1995; 483: 331 - 46.
- [72] Pavešić N. Razpoznavanje vzorcev. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko in računalništvo, 1992: 169 - 210.
- [73] Pastushenko VF, Chizmadzhev YA, Arakelyan VB. Electric breakdown of bilayer lipid membranes IV. Consideration of the kinetic stage in the case of the single-defect membrane. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 71 - 79.
- [74] Pastushenko VF, Arakelyan VB, Chizmadzhev YA. Electric breakdown of bilayer lipid membranes VI. Stochastic theory taking into account the process of defect formation and death: membrane lifetime distribution function. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 89 - 95.
- [75] Pastushenko VF, Arakelyan VB, Chizmadzhev YA. Electric breakdown of bilayer lipid membranes VII. Stochastic theory taking into account the process of defect formation and death: Statistical properties. *Bioelectroch Bioener* 1979; 6: 97 - 104.
- [76] Potter H. Application of Electroporation in Recombinant DNA Technology. *Method Enzymol* 1993; 217: 461 - 83.
- [77] Powell KT, Weaver JC. Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory. *Bioelectroch Bioener* 1986; 15: 211 - 227.
- [78] Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC. Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90: 10504 - 8.

- [79] Prausnitz MR, Milano CD, Gimm JA, Langer R, Weaver J. Quantitative study of molecular transport due to electroporation: uptake of bovine serum albumin by erythrocyte ghosts. *Biophys J* 1994; 66: 1522 – 1530.
- [80] Ramirez LH, Orlowski S, An D, Bindoula G, Dzodic R, Ardouin P, Bognel C, Belehradek J Jr, Munck JN, Mir LM. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. *British Journal of Cancer* 1998; 77: 2104 – 2111.
- [81] Rols MP, Teissie J. Electropermeabilization of mammalian cells: Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 1990; 58: 1089 – 1098.
- [82] Rols MP, Teissie J. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* 1998; 75: 1415 – 1423.
- [83] Rols MP, Teissie J. Flow cytometry quantification of electropermeabilization. V: Jaroszeski MJ, Heller R. urednika: Flow cytometry protocols. Methods in molecular biology, 1998; 91: 141-148.
- [84] 21. Rols MP, Delteil C, Serin G, Teissie J. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1994; 22: 540.
- [85] Rols MP, Teissie J. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur J Biochem* 1989; 179: 109 - 15.
- [86] Rols MP, Teissie J. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. *Biochemistry* 1990; 29: 4561 - 7.
- [87] Rols MP, Teissie J. Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electropermeabilization. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111: 45 - 50.
- [88] Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature Biotechnology* 1998; 16: 168 – 171.
- [89] Rudolf Z, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Vodovnik L, Serša G. Electrochemotherapy with bleomycin: the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radiol Oncol* 1995; 29: 229 - 35.
- [90] Sale AJH, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 781 - 8.
- [91] Sale AJH, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 1968; 163: 37 - 43.

- [92] Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Belehradec J Jr, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectroch Bioener* 1997; 43: 279 - 83.
- [93] Serša G, Kotnik V, Čemažar M, Miklavčič D, Kotnik A. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor-bearing mice - natural resistance and immune responsiveness. *Anti-Cancer Drug* 1996; 7: 785 - 91.
- [94] Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Jančar B, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer* (sprejeto v objavo).
- [95] Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Mir LM. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectroch Bioener* 1994; 35: 23 - 27.
- [96] Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450 - 5.
- [97] Serša G, Čemažar M, Šemrov D, Miklavčič D. Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectroch Bioener* 1996; 39: 61 - 6.
- [98] Serša I, Beravs K, Dodd NJF, Zhao S, Miklavčič D, Demšar F. Electric current density imaging of mice tumours. *Magnet Reson Med* 1997; 37: 404 - 9.
- [99] Serša G, Čemažar M, Menart V, Gaberc-Porekar V, Miklavčič D. Anti-tumor effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin is increased by TNF- α on SA-1 tumors in mice. *Cancer Lett* 1997; 116: 85 - 92.
- [100] Sharma V, Stebe K, Murphy JC, Tung L. Poloxamer 188 decreases susceptibility of artificial lipid membranes to electroporation. *Biophysical Journal* 1996; 71: 3229-3241.
- [101] Sixou S, Teissie J. Specific electropermeabilization of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1028: 154 - 60.
- [102] Sixou S, Teissie J. In vitro targeting of inflamed areas by electroloaded neutrophils. *Biochem Biophys Res Co* 1992; 186: 860 - 6.
- [103] Sugar IP, Neumann E. Stochastic model for electric field-induced membrane pores electroporation. *Biophysical Chemistry* 1984; 19: 211-225.
- [104] Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992; 63: 1320 - 7.

- [105] Šemrov D, Miklavčič D. Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumours in mice. *Comput Biol Med* 1998; 28: 439-448.
- [106] Troiano GC, Stebe K, Sharma V, Tung L. The electroporation of artificial planar POPC bilayers and the effects of C12E8 on its properties. *Biophysical Journal* 1998; 75:
- [107] Teissie J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys J* 1993; 65: 409 - 13.
- [108] Tekle E, Astumian RD, Chock PB. Electro-permeabilization of cell membranes: effect of the resting membrane potential. *Biochem Biophys Res Co* 1990; 172: 282 - 287.
- [109] Teruel MN, Meyer T. Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the cell body and processes of adherent cells. *Biophys J* 1997; 73: 1785-1796.
- [110] Tien HT. Bilayer lipid membranes (BLM) theory and practise. Marcel Dekker Inc., New York 1974.
- [111] Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 1991; 60: 297 - **306**.
- [112] Tsong TY, Xie TD. Mechanisms of cell transfection by electroporation: field induced DNA uptake and transfection efficiency. *IEEE* 1992; 2: 307 - 8.
- [113] Vanbever R, Lecouturier N, Preat V. Transdermal Delivery of Metoprolol by Electroporation. *Pharmaceut Res* 1994; 11: 1657 - 62.
- [114] Vodovnik L. Nevrokibernetika. Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, 1985: 1-23.
- [115] Weaver JL. Estimation of cell viability by flow cytometry. V: Jaroszeski MJ, Heller R., urednika: *Flow cytometry protocols. Methods in molecular biology*, 1998; 91: 77-84.
- [116] Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem Bioenerg* 1996; 41: 135 - 60.
- [117] Weaver JC. Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem* 1993; 51: 426 - 35.
- [118] Weaver JC. Electroporation theory. V: Nickoloff JA, urednik: *Electroporation protocols for microorganisms. Methods in Molecular Biology*, 1995; 47: 3 – 28.

- [119] White SH. A study of lipid bilayer membrane stability using precise measurements of specific capacitance. *Biophys J* 1970; 10: 1127 - 1148.
- [120] Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissie J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1994; 66: 524 - 31.
- [121] Xie TD, Sun L, Tsong TY. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection I. DNA entry by surface binding and diffusion through membrane pores. *Biophys J* 1990; 58: 13 - 19.
- [122] Xie TD, Tsong TY. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection III. Electric parameters and other conditions for effective transfection. *Biophys J* 1992; 63: 28 - 34.
- [123] Yan CN, Li F, Patterson C, Runge MS. High-voltage and high-salt buffer facilitates electroporation of human aortic smooth-muscle cells.
- [124] Yeh CG, His B, Page Faulk W. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J Immunol Methods* 1981; 43: 269-275.
- [125] Zeira M, Tosi PF, Mouneimne Y, et al. Full-length CD4 electroinserted in the erythrocyte membrane as a long-lived inhibitor of infection by human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4409 - 13.
- [126] Zimmermann U, Vienken J, Pilwat G. Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 1980; 7: 553 - 74.

Zahteve po priznanju avtorstva za izvirnost prispevkov

Na osnovi dela, prikazanega v doktorski disertaciji, prosim za priznanje naslednjih izvernih prispevkov k razumevanju ožjega znanstvenega področja:

1. Vloga električne energije pri elektroporaciji celic v *in vitro* pogojih

Pokazali smo, da skupna električna energija visokonaptostnih električnih pulzov ni odločujoč dejavnik za uspešnost elektroporacije v *in vitro* pogojih. Dokler celice izpostavljam napetostim, ki še ne povzročijo ireverzibilne elektroporacije, določa uspešnost elektropermeabilizacije med protokoli z enako električno energijo trajanje pulza. Elektropermeabilizacija je uspešnejša, kadar uporabimo daljše pulze.

2. Vpliv trajanja pravokotnih električnih pulzov in njihovega števila na elektroporacijo v *in vitro* pogojih

Naredili smo obsežno eksperimentalno študijo vpliva trajanja pravokotnih električnih pulzov in njihovega števila na preživetje celic ob elektroporaciji v *in vitro* pogojih ter na uspešnost permeabilizacije s propidijevim jodidom.

3. Določitev parametrov vrednotenja elektroporacije v *in vitro* pogojih

Na osnovi eksperimentalne študije smo definirali sledeče parametre, ki opisujejo uspešnost elektroporacije v *in vitro* pogojih: prag reverzibilne elektroporacije, prag ireverzibilne elektroporacije, širino elektroporacijskega intervala, delež živih uspešno permeabiliziranih celic in napetost, pri kateri ta delež dosežemo. Z definicijami kriterijskih funkcij smo nakazali nov pristop k optimizaciji električnih parametrov elektroporacije za izbrano aplikacijo.

4. Vpliv časovnega razmika med pravokotnimi pulzi na porušitveno napetost lipidnega dvosloja

S študijo vpliva frekvence pulzov v vlaknu na porušitveno napetost planarnega lipidnega dvosloja smo poiskali frekvenco, s katero lahko učinkovito znižamo njegovo porušitveno napetost.

Dodatek

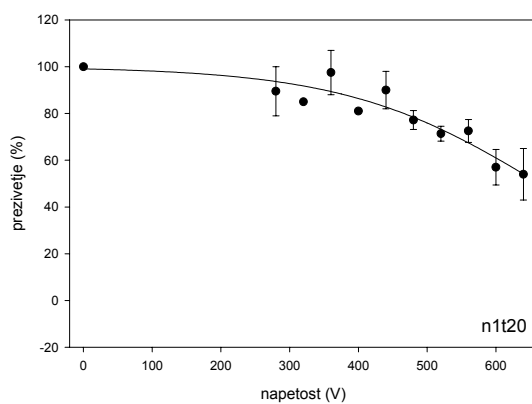
V dodatku smo zbrali rezultate meritev deleža preživelih celic ob elektroporaciji in deleža fluorescentnih celic ob elektropermeabilizaciji s propidijevim jodidom v odvisnosti od napetosti. Meritve smo opravili pri enem pulzu in vlakih štirih, osmih, šestnajstih in štiriinšestdesetih pulzov. Pulzi v vlaku so si sledili s frekvenco 1 Hz. Trajanje posameznega pulza v vlaku je bilo 20 μ s, 100 μ s, 500 μ s oziroma 1000 μ s. Rezultatom smo prilagodili sigmoidne krivulje oblike:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{b}}} .$$

Parametri a, b, x0 in y0 posamezne sigmoide so zapisani ob krivulji.

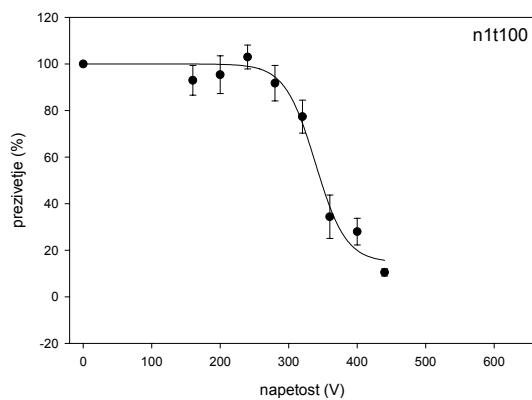
1 pulz dolžine 0,02 ms

a 100.0000
b -142.6255
x0 663.5687
y0 0.0000



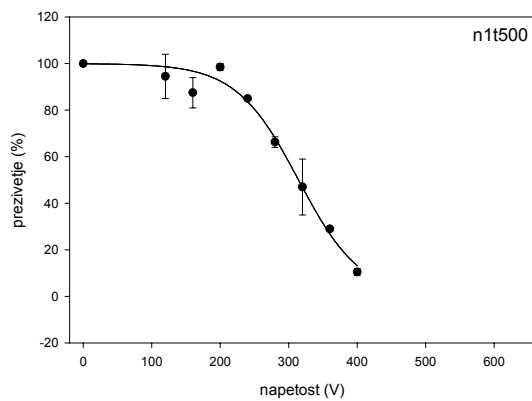
1 pulz dolžine 0,1 ms

a 85.1957
b -22.2526
x0 339.0312
y0 14.8043



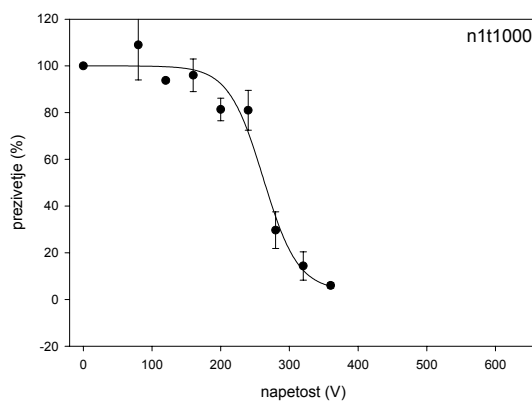
1 pulz dolžine 0,5 ms

a 100.0000
b -45.5492
x0 314.3625
y0 0.0000

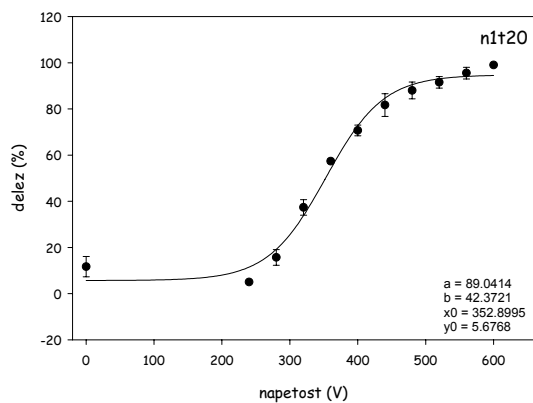


1 pulz dolžine 1 ms

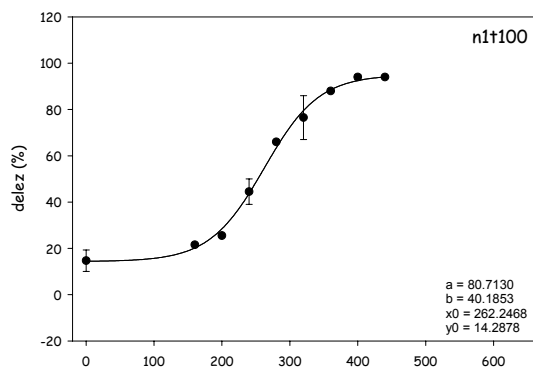
a 96.2672
b -25.2669
x0 261.9425
y0 3.7328



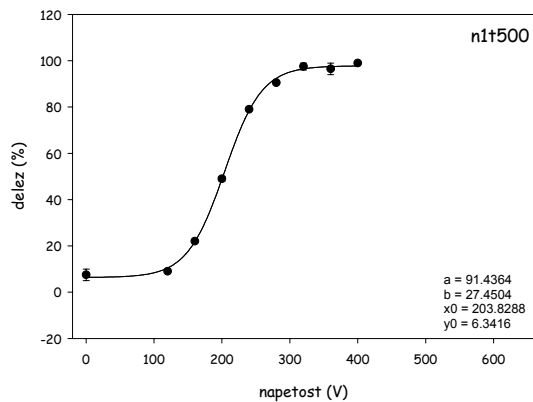
1 pulz dolžine 0,02 ms



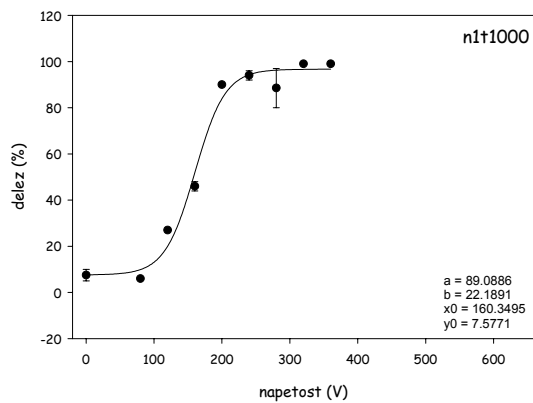
1 pulz dolžine 0,1 ms



1 pulz dolžine 0,5 ms

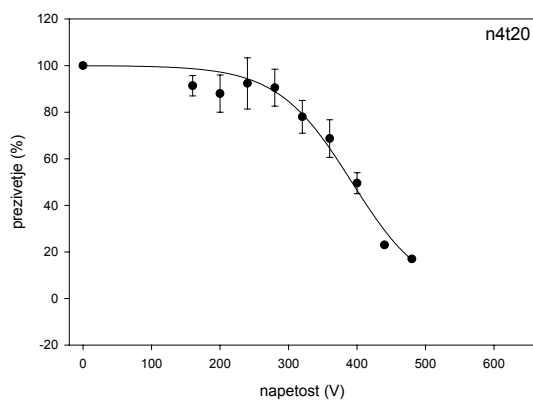


1 pulz dolžine 1 ms



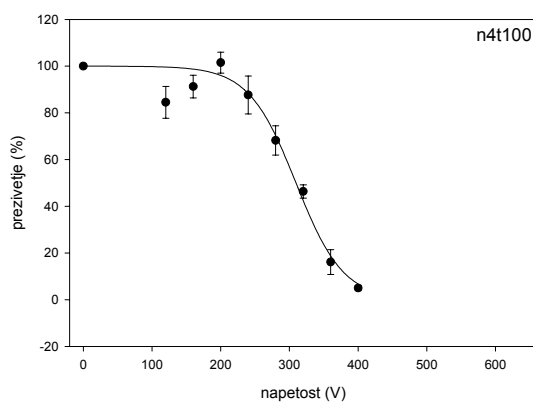
4 pulzi dolžine 0,02 ms

a 100.0000
b -54.1711
x0 392.2917
y0 0.0000



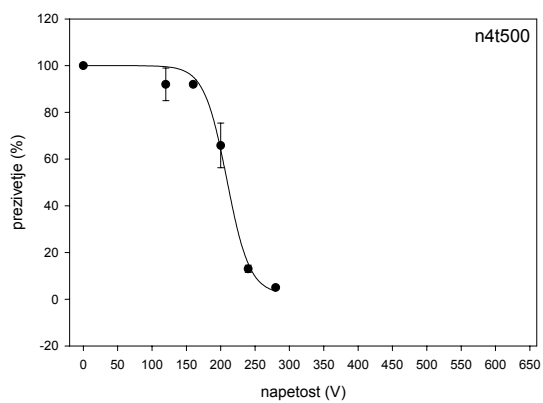
4 pulzi dolžine 0,1 ms

a 100.0000
b -34.4023
x0 309.5304
y0 0.0000



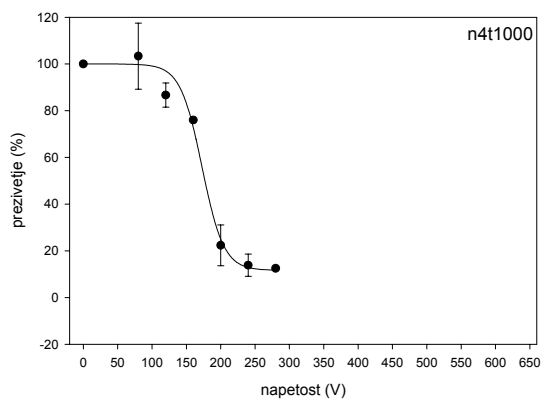
4 pulzi dolžine 0,5 ms

a 97.8135
b -16.5836
x0 208.9743
y0 2.1865

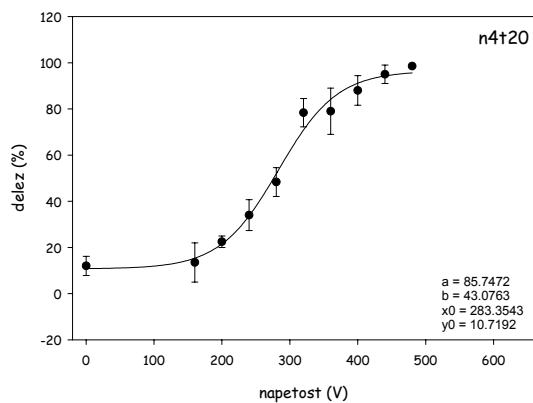


4 pulzi dolžine 1 ms

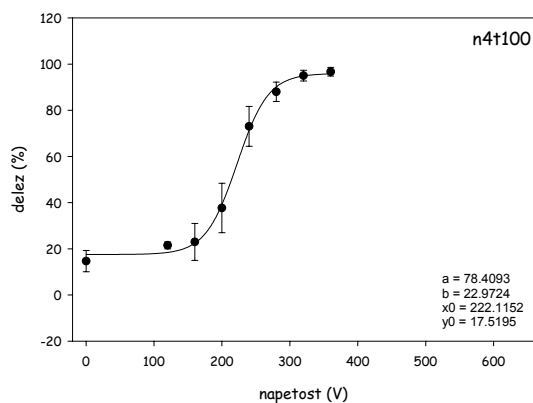
a 88.3517
b -15.7897
x0 172.8324
y0 11.6483



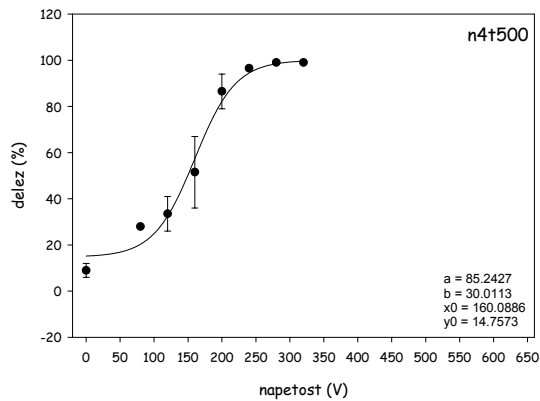
4 pulzi dolžine 0,02 ms



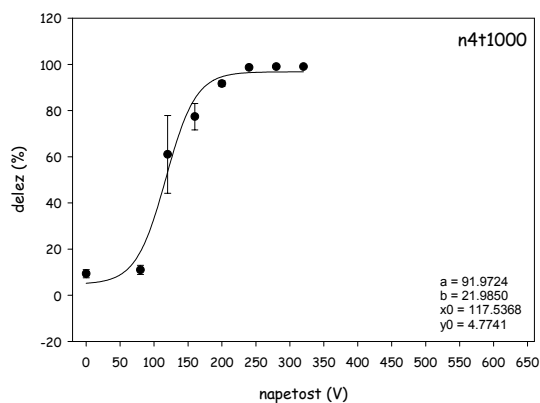
4 pulzi dolžine 0,1 ms



4 pulzi dolžine 0,5 ms

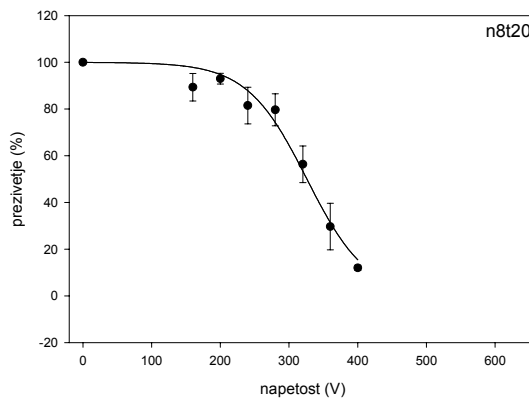


4 pulzi dolžine 1 ms



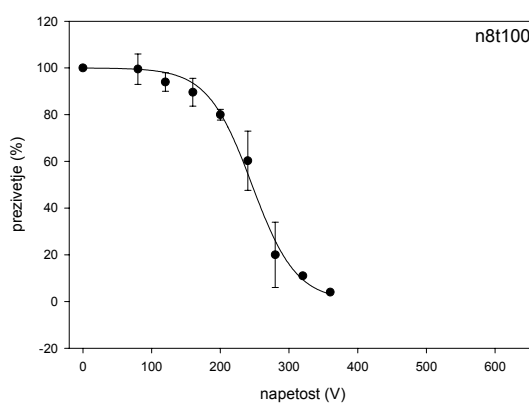
8 pulzov dolžine 0,02 ms

a 100.0000
b -43.5429
x0 325.9972
y0 0.0000
x(50%) = 326 V



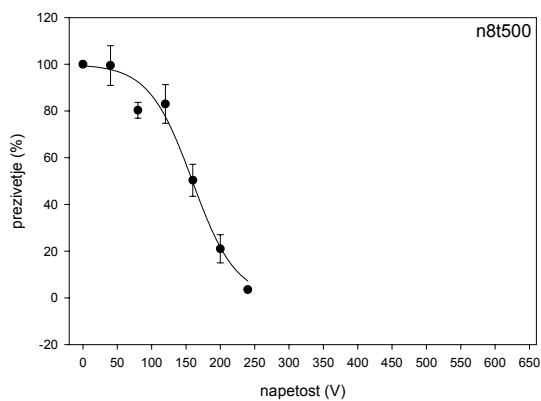
8 pulzov dolžine 0,1 ms

a 99.6982
b -32.2516
x0 245.8265
y0 0.3018
x(50%) = 246 V



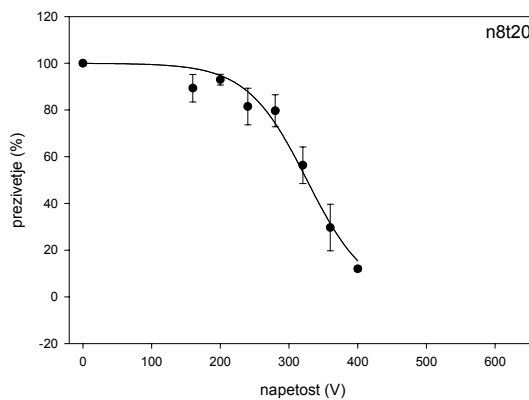
8 pulzov dolžine 0,5 ms

a 100.0000
b -31.6521
x0 159.2981
y0 0.0000
x(50%) = 159 V

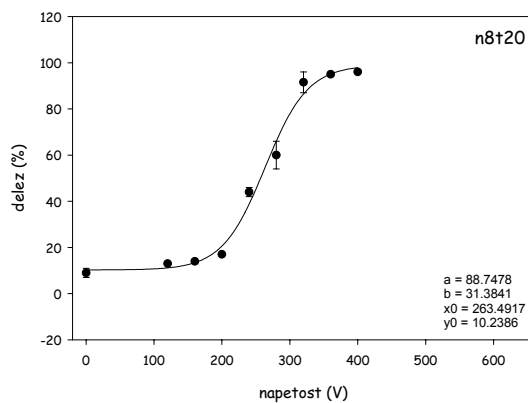


8 pulzov dolžine 1 ms

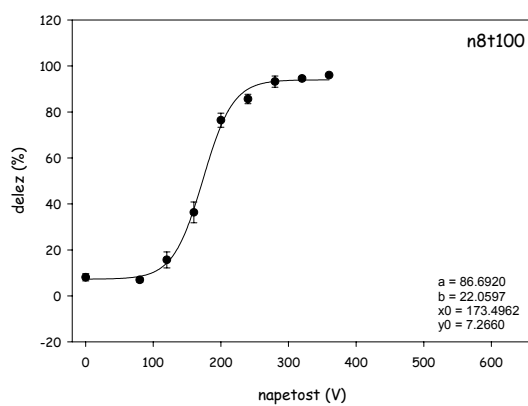
a 94.8671
b -16.8450
x0 144.9770
y0 5.1329
x(50%) = 146 V



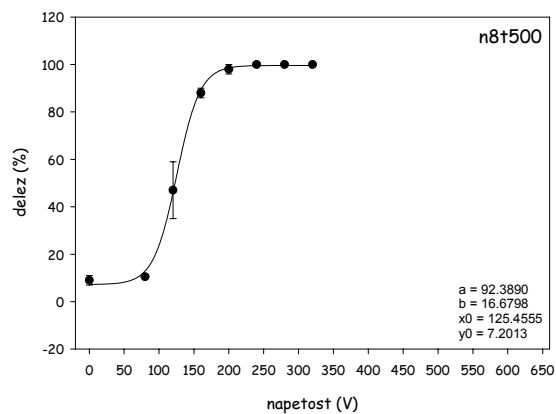
8 pulzov dolžine 0,02 ms



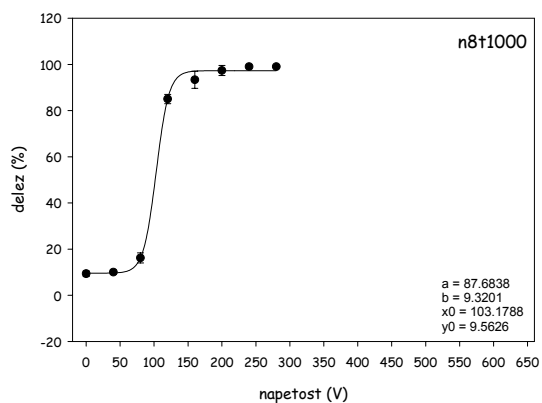
8 pulzov dolžine 0,1 ms



8 pulzov dolžine 0,5 ms

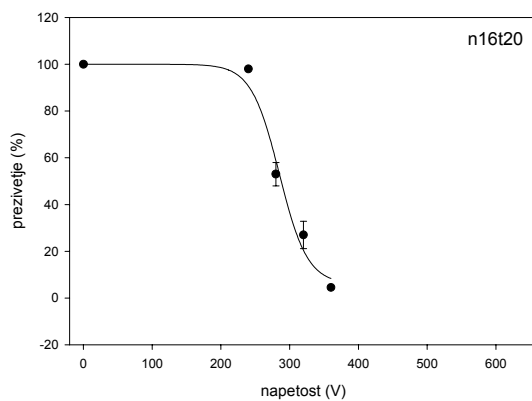


8 pulzov dolžine 1 ms



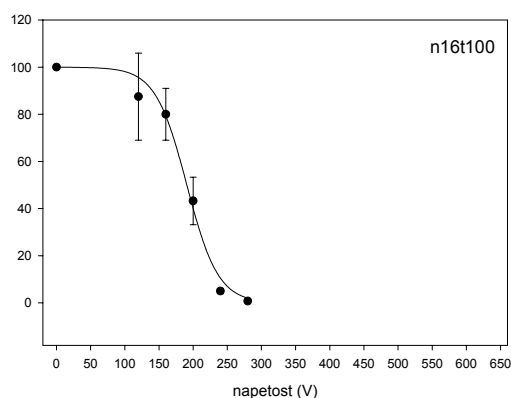
16 pulzov dolžine 0,02 ms

a 100.0000
b -22.9369
x0 190.7840
y0 0.0000
x(50%) = 191 V



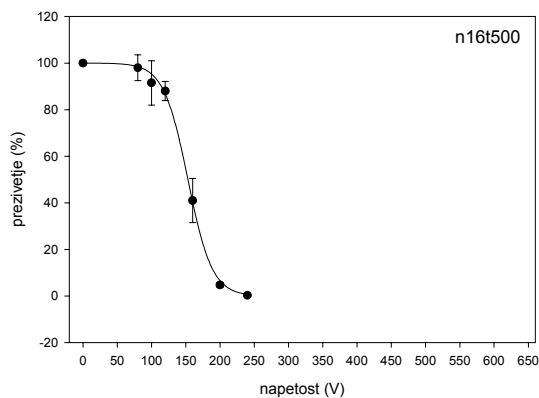
16 pulzov dolžine 0,1 ms

a 87.5623
b -8.2709
x0 106.1019
y0 12.4377
x(50%) = 108 V



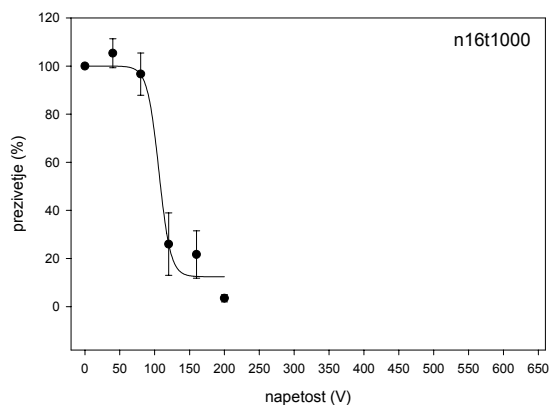
16 pulzov dolžine 0,5 ms

a 93.9721
b -20.4561
x0 285.0247
y0 6.0279
x(50%) = 287 V

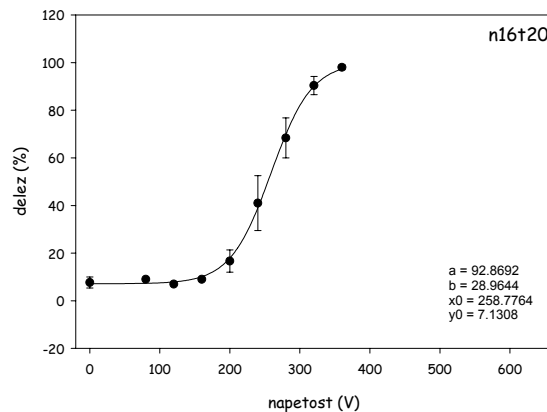


16 pulzov dolžine 1 ms

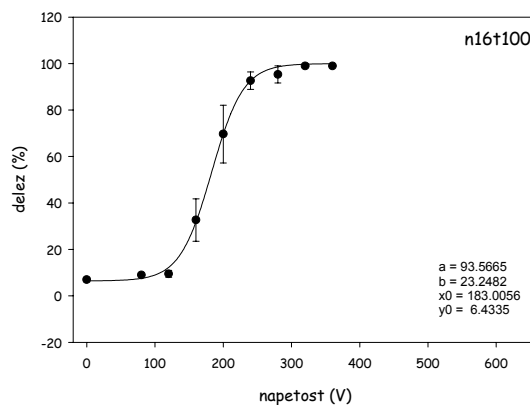
a 100.0000
b -17.6679
x0 153.1307
y0 0.0000
x(50%) = 153 V



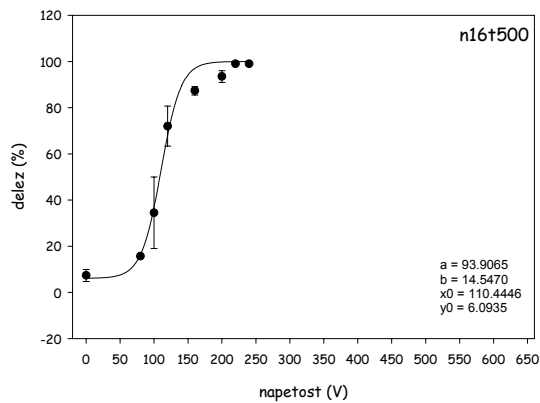
16 pulzov dolžine 0,02 ms



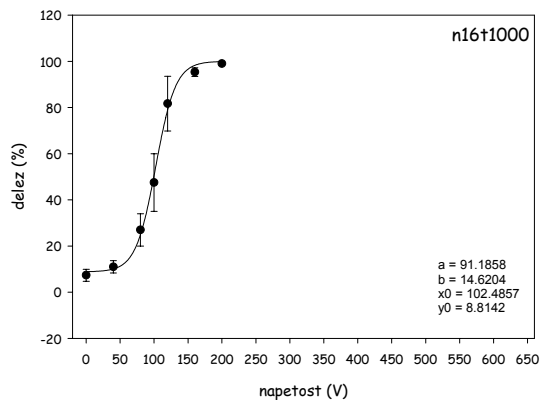
16 pulzov dolžine 0,1 ms



16 pulzov dolžine 0,5 ms

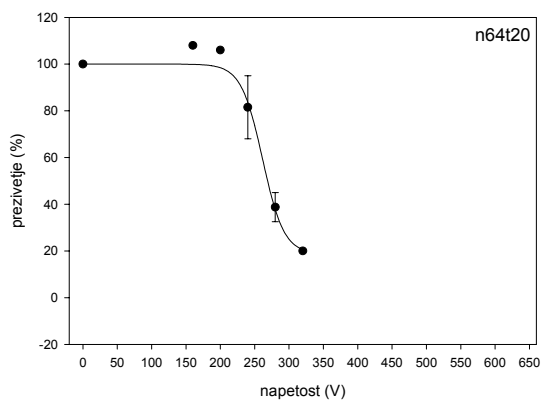


16 pulzov dolžine 1 ms



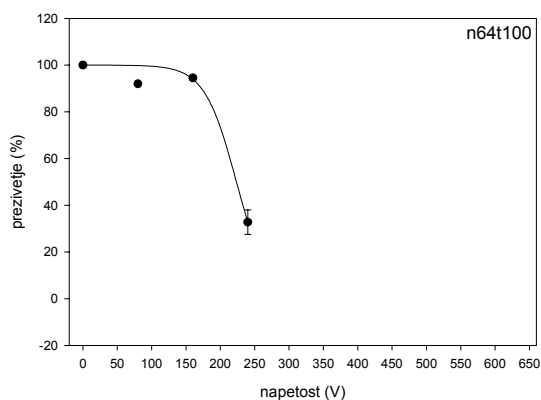
64 pulzov dolžine 0,02 ms

a 81.2778
b -15.5955
x0 261.4268
y0 18.7222
x(50%) = 268 V



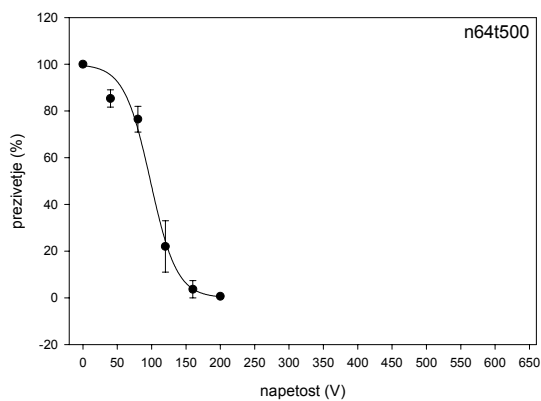
64 pulzov dolžine 0,1 ms

a 100.0000
b -23.1338
x0 223.4300
y0 0.0000
x(50%) = 223 V



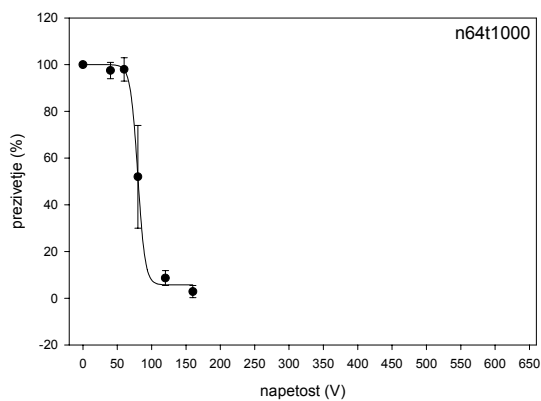
64 pulzov dolžine 0,5 ms

a 100.0000
b -19.1445
x0 98.2541
y0 0.0000
x(50%) = 98 V

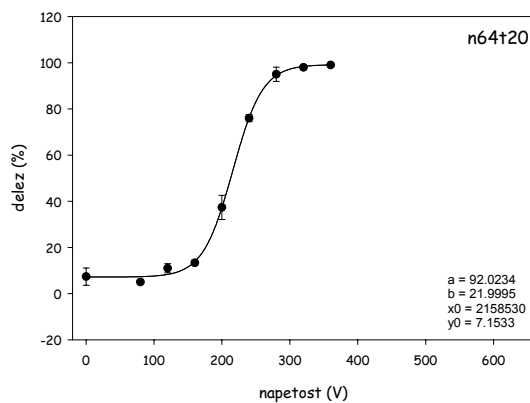


64 pulzov dolžine 1 ms

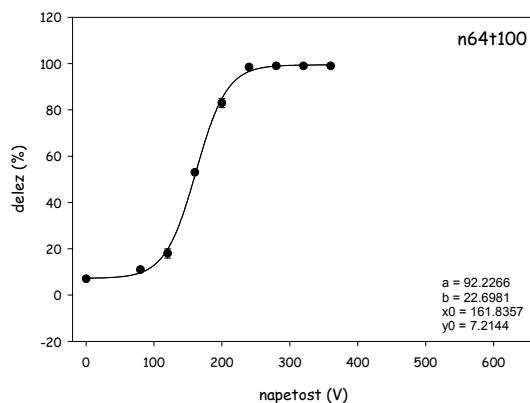
a 94.3012
b -5.3441
x0 79.8131
y0 5.6988
x(50%) = 80.5 V



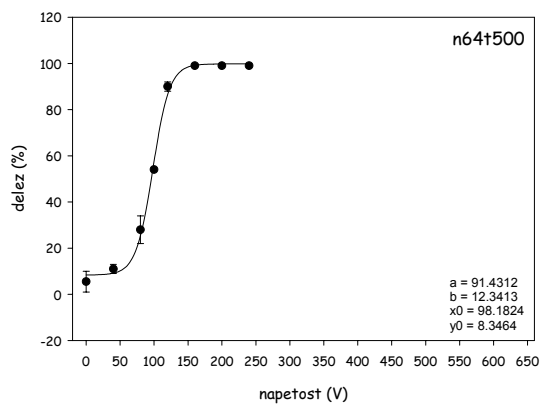
64 pulzov dolžine 0,02 ms



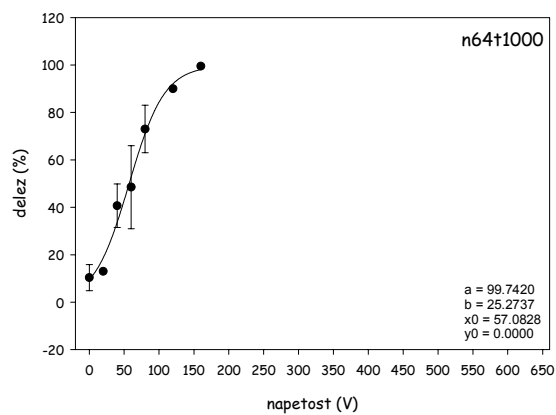
64 pulzov dolžine 0,1 ms



64 pulzov dolžine 0,5 ms



64 pulzov dolžine 1 ms



Izjava

Izjavljam, da sem avtorica te disertacije, ki je nastala kot plod raziskovalnega dela pod mentorstvom izr. prof. Damijana Miklavčiča in somentorja izr. prof. Gregorja Serše. Izkazano pomoč drugih sodelavcev sem v celoti navedla v Zahvali. Že objavljeni dosežki drugih avtorjev so navedeni v Literaturi.

Alenka Maček Lebar